

Université de Sherbrooke

Rôle du facteur de transcription CDP dans l'épithélium intestinal  
colonique et dans la prolifération cellulaire

Par **Isabelle Fréchette**  
Département d'Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)  
en biologie cellulaire

Mémoire évalué par :

Dr François Boudreau, département d'Anatomie et biologie cellulaire

Dr Claude Asselin, département d'Anatomie et biologie cellulaire

Dr Simon Labbé, département de Biochimie

Mai 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-25989-4*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-25989-4*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

# Table des matières

Table des matières.....	II
Liste des illustrations.....	VII
Liste des sigles, abréviations et symboles.....	IX
Liste des communications.....	XII
Résumé.....	XIII
I-Introduction.....	1
1. L'épithélium intestinal et l'axe crypte-villosité.....	1
1.1 Structure de l'épithélium intestinal.....	1
1.2 Structure de l'épithélium colonique.....	3
2. Le facteur de transcription CDP.....	4
2.1 Généralités.....	4
2.2 Domaines de la protéine CDP.....	5
2.3 Activité de répression transcriptionnelle de CDP.....	8
2.4 Cycle cellulaire et CDP.....	11
2.5 Activité de liaison de CDP à l'ADN pendant le cycle cellulaire.....	12
2.6 Rôles de CDP <i>in vivo</i> .....	14
3. Le facteur de transcription PLZF.....	16
3.1 Généralités.....	16
4. Hypothèse de recherche et objectifs.....	17
II-Matériel et méthodes.....	20
1. Le modèle murin CDP $\Delta$ HD.....	20
2. Culture cellulaire.....	20
2.1 Cellules 293T.....	20

2.2	Cellules HIEC.....	22
2.3	Cellules Caco 2/15.....	22
2.4	Cellules T84.....	23
2.5	Cellules Colo 205.....	23
2.6	Cellules DLD-1.....	23
3.	Traitement des cellules avec les inhibiteurs de protéases.....	24
4.	Préparation de la construction pGL3 basic/PLZF 3 kb 5'-UTR.....	24
4.1	Extraction de l'ADN génomique des cellules HIEC.....	24
4.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	25
4.3	Sous-clonage des fragments amplifiés du gène PLZF dans le vecteur de transition pBluescript KS(-) et TOPO TA.....	26
4.4	Clonage du fragment de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF dans le vecteur luciférase pGL3basic.....	27
5.	Essais luciférase.....	29
5.1	Préparation des cellules.....	29
5.2	Transfection transitoire.....	29
5.2.1.	Préparation des ADNs.....	29
5.2.2.	La transfection.....	29
5.3	Lyse des cellules et essai luciférase.....	30
6.	Activité de liaison du facteur de transcription CDP à l'ADN.....	31
6.1	Préparation des oligonucléotides pour les sondes radioactives.....	31
6.2	Réaction de liaison à l'ADN et gel de rétention.....	32
7.	Isolement des protéines et analyse Western.....	33
7.1	Extraction des protéines totales.....	33
7.1.1.	Des cellules.....	33



7.1.2. Du tissu fœtal humain (Matrisperse).....	33
7.1.3. Des polypes coloniques.....	34
7.2 Immunobuvardage de type Western.....	34
7.2.1. Préparation des échantillons de protéines, migration et transfert.....	35
7.2.2. Détection des antigènes.....	35
8. Établissement des lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain.....	36
8.1 Production des rétrovirus.....	36
8.1.1. Préparation des ADNs.....	36
8.1.2. Transfection stable.....	37
8.1.3. Récolte des virus.....	37
8.2 Infection des lignées cancéreuses colorectales humaines.....	37
8.3 La sélection.....	38
9. Décompte cellulaire.....	38
9.1 Préparation des cellules.....	38
9.2 Coloration des cellules au Trypan bleu et décompte des cellules.....	38
10. Fractionnement des cellules épithéliales le long de la crypte colonique de souris adultes.....	39
11. Extraction de l'ARN total.....	40
11.1 Réaction de polymérisation en chaîne avec la transcriptase inverse (RT-PCR).....	41
11.2 PCR quantitatif en temps réel.....	42
III-Résultats.....	44
1. Caractérisation de l'interaction du facteur CDP avec le gène PLZF.....	44
1.1 La région 5'-UTR du gène PLZF est une cible du facteur CDP.....	44

1.2 Capacité de liaison de CDP sur la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF.....	50
1.3 Corrélation entre les niveaux d'expression de CDP et de PLZF dans les différentes lignées cancéreuses colorectales humaines.....	50
1.4 Profil d'expression du messager de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines et dans les colonocytes fœtaux humains.....	54
2. Étude du rôle de CDP dans la prolifération épithéliale colonique et dans la progression du cancer colorectal.....	56
2.1 Détermination de l'isoforme de CDP exprimée le long de l'axe vertical de la crypte colonique chez la souris adulte.....	56
2.2 Expression ectopique de CDP dans les lignées stables de cellules cancéreuses colorectales humaines.....	57
2.3 Caractérisation du comportement prolifératif de la lignée stable d'adénocarcinome de côlon humain Caco 2/15 qui surexprime CDP.....	61
2.4 Analyse de la stabilité de la protéine CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines.....	63
2.5 Détermination de l'expression de CDP dans les polypes coloniques de souris APC/Min.....	64
IV-Discussion.....	67
1. Le gène PLZF est une cible du facteur de transcription CDP dans le contexte de l'épithélium intestinal.....	67
2. Le facteur de transcription CDP est impliqué dans la prolifération épithéliale colonique et dans la progression du cancer colorectal.....	73
V-Conclusions et perspectives.....	82

Remerciements.....	85
Bibliographie.....	87

# Liste des illustrations

## FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Structure de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon.....	2
<b>Figure 2.</b>	Les domaines fonctionnels de la protéine CDP.....	7
<b>Figure 3.</b>	Séquences consensus de liaison des dimères de domaines de CDP.....	9
<b>Figure 4.</b>	Génération des souris mutantes CDP $\Delta$ HD.....	21
<b>Figure 5.</b>	Niveaux d'expression colonique du messenger de PLZF chez la souris.....	45
<b>Figure 6.</b>	Interaction potentielle de CDP avec le gène PLZF.....	47
<b>Figure 7.</b>	Effet fonctionnel de CDP sur le gène PLZF dans les cellules 293T et dans la lignée d'adénocarcinome de côlon humain T84.....	48-49
<b>Figure 8.</b>	Sites d'interaction potentiels de CDP avec la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF.....	51
<b>Figure 9.</b>	Profil d'expression protéique de CDP et de PLZF dans des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain.....	53
<b>Figure 10.</b>	Profil d'expression du messenger de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines et dans les colonocytes fœtaux humains.....	55
<b>Figure 11.</b>	Expression différentielle de CDP dans la crypte colonique chez la souris adulte.....	58
<b>Figure 12.</b>	Détermination de l'expression de CDP exogène dans les différentes lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain.....	60
<b>Figure 13.</b>	Effet de la surexpression de CDP sur le comportement prolifératif des cellules de la lignée stable d'adénocarcinome de côlon humain	

	Caco 2/15.....	62
<b>Figure 14.</b>	Effet des inhibiteurs de protéases sur la stabilité de la protéine CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines T84 et Colo 205..	65
<b>Figure 15.</b>	Expression de CDP dans les polypes coloniques de souris APC/Min..	66

## TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Liste des amorces utilisées pour amplifier les différentes régions du gène PLZF et conditions de PCR.....	26
<b>Tableau 2.</b>	Séquences des oligonucléotides utilisés pour le gel de rétention.....	32
<b>Tableau 3.</b>	Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par transfert Western.....	36
<b>Tableau 4.</b>	Séquences des amorces utilisées en PCR quantitatif en temps réel pour vérifier l'expression du messager de CDP et de PLZF.....	43
<b>Tableau 5.</b>	Calibrateur et gène de référence employés pour l'amplification du messager de CDP et de PLZF en PCR quantitatif en temps réel.....	43

## Liste des sigles, abréviations et symboles

Note : Comme dans la littérature en générale, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations ci-dessous, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèses) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

a.a.	acide aminé
ADN	acide déoxyribonucléique
ADN <sub>c</sub>	acide déoxyribonucléique complémentaire
APC/Min	<i>Adenomatous polyposis coli/Multiple intestinal neoplasia</i>
APL	leucémie promyélocytique sévère ( <i>acute promyelocytic leukemia</i> )
ARN <sub>m</sub>	acide ribonucléique messager
ATF-1	facteur de transcription activateur ( <i>activating transcription factor</i> )
BSA	albumine de sérum bovin ( <i>bovine serum albumine</i> )
BTB/POZ	domaine <i>bric-à-brac</i> , <i>tramtrack</i> , <i>brad complex/poxvirus zinc finger</i>
CAD	carbamoyl-phosphate synthase-aspartate carbamoyltransférase-dihydroorotase
CBF	facteur de liaison à la séquence CCAAT ( <i>CCAAT binding factor</i> )
CBP	protéine liant la séquence CREB ( <i>CREB-binding protein</i> )
Cdk	kinase dépendante des cyclines ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
CDP	protéine de déplacement CCAAT ( <i>CCAAT-displacement protein</i> )
CFTR	gène régulateur de la conductance transmembranaire dans la fibrose kystique ( <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i> )
ChIP	immunoprécipitation de la chromatine ( <i>chromatin immunoprecipitation</i> )
CKII	caséine kinase II

ct	cut wing
CTD	domaine en C-terminal ( <i>carboxy terminal domain</i> )
DMEM	milieu de Eagle modifié par Dulbecco ( <i>Dulbecco modified Eagle's medium</i> )
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DHFR	dihydrofolate réductase
DTT	dithiothréitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	sérum bovin fœtal ( <i>fetal bovine serum</i> )
GST	glutathione S-transférase
GFP	protéine de fluorescence verte ( <i>green fluorescent protein</i> )
G9a	histone lysine méthyltransférase
HAT	histone acétyltransférase
HDAC	histone déacétylase
HEPES	4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthane sulfonate
HIEC	cellules épithéliales intestinales de cryptes humaines ( <i>human intestinal epithelial cells</i> )
HiNF-D	<i>histone nuclear factor D</i>
HKMT	histone lysine méthyltransférase
HS	manteau du poil ( <i>hair shaft</i> )
IRS	racine de la gaine intérieure ( <i>inner root sheat</i> )
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
kf	kinked femur
KRP	tampon Krebs-ringer-Phosphate

NaF	fluorure de sodium ( <i>sodium fluoride</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OC	gène ostéocalcine ( <i>osteocalcin gene</i> )
ORS	racine de la gaine extérieure ( <i>outer root sheat</i> )
PCAF	facteur associé à la protéine p300/CBP ( <i>p300/CBP-associated factor</i> )
PCR	réaction de polymérisation en chaîne ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKC	protéine kinase C
PLB	tampon de lyse passif ( <i>passive lysis buffer</i> )
PLZF	facteur de transcription promyélocytique à doigt de zinc ( <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> )
pRb	protéine du rétinoblastome
RAR $\alpha$	récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque ( <i>retinoic acid receptor</i> )
SI	sucrase-isomaltase
TBP	protéine de liaison à la boîte TATA ( <i>TATA binding protein</i> )
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylène diamine
TNF	facteur nécrosant ( <i>tumor necrosis factor</i> )
UTR	région non traduite ( <i>untranslated region</i> )



## Liste des communications

1. Fréchette, I., Boudreau, F. 2005. PLZF is a Target of the Transcriptional Repressor CDP in the Intestinal Epithelium. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Cell Biology, San Francisco (présentation d'un poster)
2. Fréchette, I., Boudreau, F. 2005. PLZF est une cible transcriptionnelle de CDP au niveau de l'épithélium colonique. 73<sup>ième</sup> Réunion annuelle de l'ACFAS, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec (présentation orale).
3. Fréchette, I., Boudreau, F. 2005. PLZF, un marqueur des cellules souches, est une cible transcriptionnelle de CDP au niveau de l'épithélium colonique. 34<sup>ième</sup> Édition de la journée scientifique (30 mars), Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke (j'ai été sélectionnée par les professeurs-chercheurs et par les étudiants du département pour présenter un poster)
4. Fréchette, I., Boudreau, F. 2005. PLZF est une cible transcriptionnelle de CDP au niveau de l'épithélium colonique. 5<sup>ième</sup> Édition de la journée de la recherche (9 février), Université de Sherbrooke, Sherbrooke (présentation d'un poster)
5. Fréchette, I., Boudreau, F. 2004. Rôle des facteurs de transcription CDP et PLZF dans le maintien de l'épithélium intestinal colonique. 46<sup>ième</sup> Réunion annuelle du CRCQ, Beaufort, Québec (présentation orale).

# Résumé

Rôle du facteur de transcription CDP dans l'épithélium intestinal colonique et dans la prolifération cellulaire

**Isabelle Fréchette**, Département d'anatomie et biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke

Le rôle du facteur de transcription CDP dans la répression colonique du gène de la sucrase-isomaltase (SI) durant le développement murin a récemment été démontré. L'implication de CDP dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium colonique demeure toutefois inexplorée. Le but général de ce présent travail fut donc de mieux comprendre le rôle de CDP dans le côlon. Tout d'abord, une étude différentielle par criblage de micropuces à ADN a permis d'identifier PLZF comme un gène cible de CDP dans le côlon. Un des objectifs de cette étude fut donc de caractériser l'interaction entre le facteur de transcription CDP et le gène PLZF. Une analyse informatique du gène PLZF a prédit 21 sites potentiels de liaison pour le facteur CDP. Un gel de rétention permettant l'étude des sites potentiellement liés par CDP dans une région du gène qui contient le plus de sites potentiels de liaison, soit la région de 3 kb 5'-UTR située en amont du site d'initiation de la traduction, a identifié cinq sites sur lesquels CDP a la capacité de se lier. Des essais luciférase ont montré une réduction de l'activité transcriptionnelle de la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF par CDP. Une analyse Western a permis de corrélérer les niveaux d'expression de CDP et de PLZF dans les lignées d'adénocarcinomes de côlon humain. La protéine

CDP p200 n'est pas détectée dans les lignées cancéreuses colorectales alors qu'elle est exprimée dans le tissu foetal sain de côlon humain. Au contraire, la protéine PLZF est fortement exprimée dans la majorité des lignées, mais elle n'est pas détectée dans les colonocytes foetaux humains normaux. Une analyse par PCR quantitatif en temps réel a montré que l'absence d'expression de CDP p200 dans la plupart des cellules n'est pas corrélée avec une diminution des niveaux d'expression du messenger de CDP. Le second objectif de ce travail consistait à approfondir la fonction de la protéine CDP dans l'épithélium colonique. La protéine CDP p200 est la seule isoforme retrouvée selon un gradient d'expression le long de l'axe vertical de la crypte colonique tel que démontré par analyse Western. Une analyse de la prolifération cellulaire de la lignée stable Caco 2/15 qui surexprime CDP a permis d'observer une augmentation du rythme prolifératif des cellules Caco 2/15 CDP par rapport aux cellules contrôles. Cet accroissement de la prolifération corrèle avec une plus grande production de la forme clivée de CDP p110 comme démontré par analyse Western. Le traitement des cellules au MG132 a permis de déterminer que la voie d'inhibition du protéasome semble stabiliser la production de CDP p200. Enfin, des résultats préliminaires concernant le rôle de CDP dans la tumorigénèse intestinale ont permis de mettre en évidence une expression de CDP p110 dans les polypes coloniques de souris APC/Min. Les résultats de cette étude suggèrent que le gène PLZF est une cible transcriptionnelle de CDP et que le facteur CDP est impliqué dans le maintien d'un épithélium colonique fonctionnel.

# I-Introduction

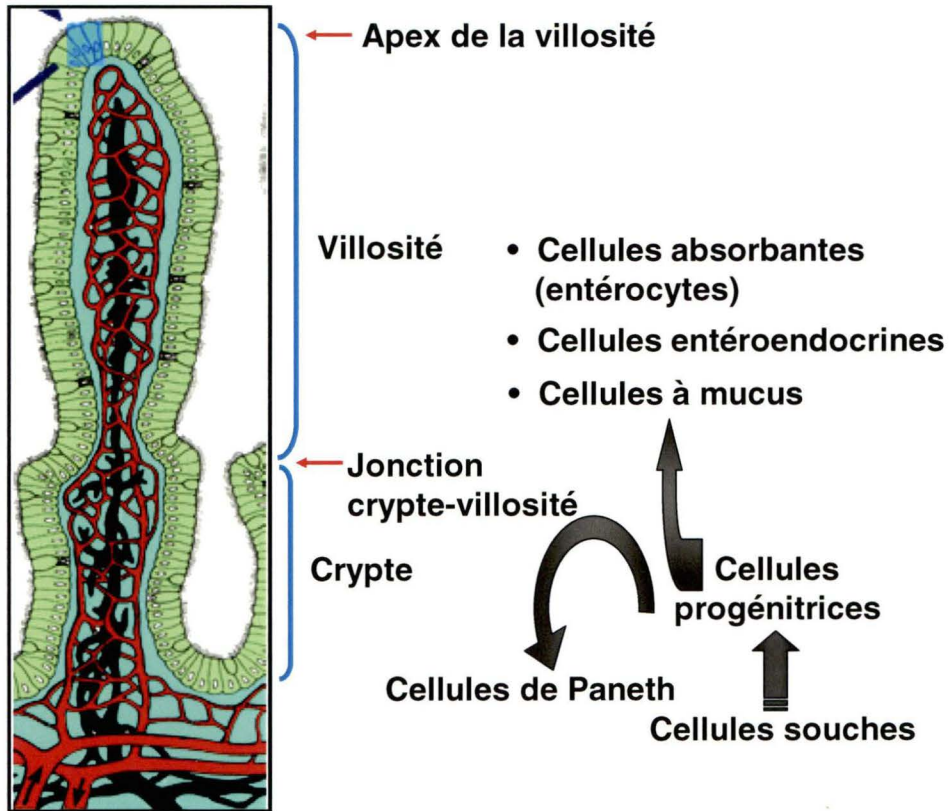
## 1. L'épithélium intestinal et l'axe crypte-villosité

### 1.1 Structure de l'épithélium intestinal

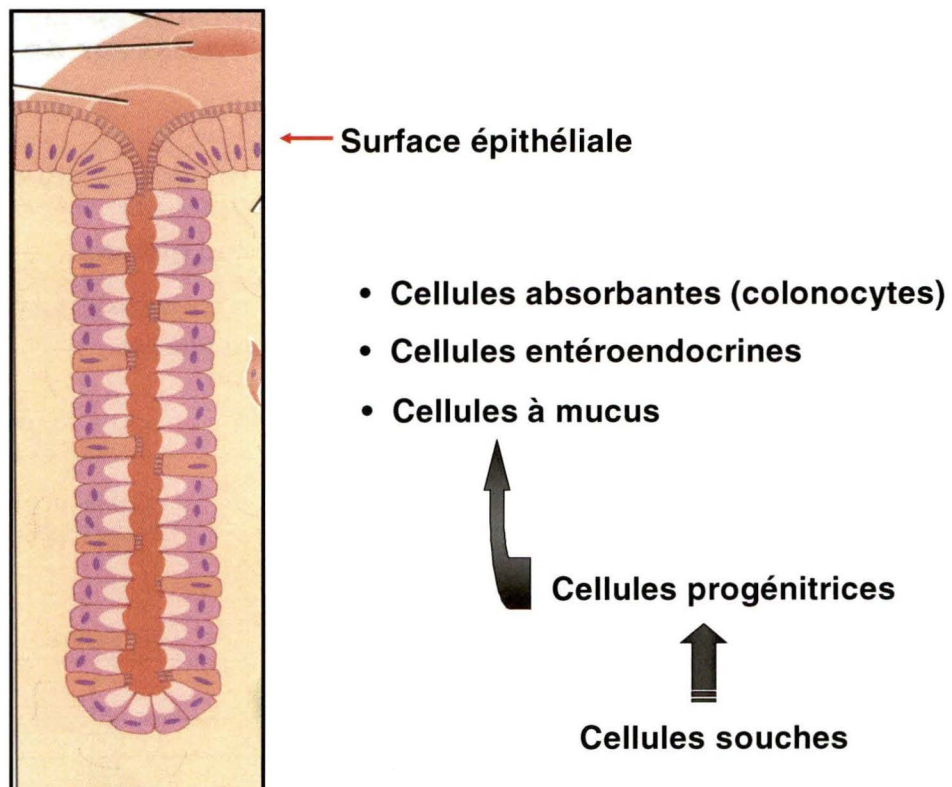
L'intestin grêle est une portion du tractus gastro-intestinal qui est divisé en trois parties bien distinctes soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Miller et Crane, 1961). La muqueuse de l'intestin grêle est responsable d'absorber les nutriments issus de la digestion du chyme et de les acheminer dans le système sanguin et lymphatique. L'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle est l'axe crypte-villosité (Sancho *et al.*, 2004) (Figure 1A). La crypte correspond au compartiment qui contient les cellules prolifératives et la villosité à celui des cellules différenciées. Les cellules souches pluripotentes, qui se trouvent ancrées à la base même de la crypte, prolifèrent et donnent naissance à des cellules progénitrices qui migrent le long de l'axe crypte-villosité jusqu'au deux-tiers de la crypte où elles entament un processus de différenciation. À la jonction crypte-villosité, les cellules sont pleinement différenciées. Les cellules souches donnent naissance à quatre principaux types de cellules différenciées : les cellules les plus abondantes, soit les entérocytes (cellules absorbantes), qui sécrètent des hydrolases et qui sont responsables de l'absorption des nutriments (Fawcett, 1965); les cellules à mucus, cellules qui protègent l'épithélium intestinal en sécrétant du mucus (Gambus *et al.*, 1993); les cellules entéroendocrines lesquelles sécrètent des hormones telles la sécrétine, la sérotonine et la substance P (Hocker et Wiedenmann, 1998). Ces trois types de cellules différenciées sont localisés entièrement dans la villosité (Sancho *et al.*, 2004). Le dernier type de cellule

**Figure 1. Structure de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon (A)** Les cellules souches du compartiment prolifératif localisées à la base de la crypte génèrent constamment des cellules progénitrices qui migrent le long de la crypte jusqu'à la jonction crypte-villosité où elles se retrouvent pleinement différenciées. À la fin de leur migration, les cellules se détachent et meurent par apoptose à l'apex de la villosité. Les cellules absorbantes (entérocytes), les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines sont les trois types de cellules différenciées retrouvées dans la villosité. Les cellules de Paneth subissent une migration descendante et sont situées dans le fond de la crypte. **(B)** L'épithélium colonique est composé exclusivement de longues glandes (cryptes) et d'un épithélium de surface plat. Similaire à l'épithélium intestinal, les cellules souches sont localisées dans le fond de la crypte. Elles subissent plusieurs divisions cellulaires afin de se renouveler et de donner naissance aux cellules progénitrices lesquelles migrent le long de la crypte et, progressivement, entament leur processus de différenciation cellulaire. Près de la surface épithéliale, les cellules sont pleinement différenciées. Les cellules souches donnent naissance à trois types de cellules différenciées, soit les cellules absorbantes (colonocytes), les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines. Contrairement à l'intestin grêle, il n'y a pas de cellules de Paneth dans le côlon.

## A L'axe crypte-villosité de la muqueuse de l'intestin grêle



## B La crypte colonique



différenciée, soit les cellules de Paneth, subissent une migration descendante le long de la crypte et, par conséquent, se retrouvent dans le fond des cryptes près des cellules souches. Les cellules de Paneth protègent l'épithélium de surface des invasions bactériennes en sécrétant des enzymes antimicrobiennes telles la cryptidine, la défensine et les lysozymes (Porter *et al.*, 2002). La surface d'absorption de l'intestin grêle est augmentée non seulement par les nombreuses villosités qui le peuplent, mais aussi par un nombre incalculable de microvillosités retrouvées exclusivement du côté apical des cellules absorbantes; c'est ce qu'on appelle la bordure en brosse (Miller et Crane, 1961; Fawcett, 1965). Chez l'humain, le renouvellement cellulaire de l'intestin grêle se fait à tous les 5 à 7 jours et est assuré par un équilibre entre la prolifération des cellules souches et le détachement constant des cellules par anoïkose à l'apex de la villosité (Sancho *et al.*, 2004). Cette prolifération cellulaire est assurée par la présence d'une niche au fond des cryptes permettant ainsi la production constante de nouvelles cellules (Kim et Shibata, 2002).

## 1.2 Structure de l'épithélium colonique

Le côlon est aussi subdivisé en plusieurs parties : le cæcum, le côlon ascendant, transverse, descendant, sigmoïde, le rectum et le canal anal; il se termine par l'anus (Bjerknes et Cheng, 1981). La principale fonction du côlon est l'élimination des résidus non absorbés sous forme de matières solides appelées fèces. L'épithélium colonique diffère de l'épithélium de l'intestin grêle en ce sens qu'il ne possède pas de villosités; il est exclusivement constitué de longues cryptes (glandes) et d'un épithélium de surface plat (Figure 1B) (Sancho *et al.*, 2004). Le compartiment de cellules prolifératives est situé dans les deux tiers inférieurs de la crypte et il est

composé des cellules souches; dans le tiers supérieur de la crypte, se trouve le compartiment de cellules différenciées composé de colonocytes (cellules absorbantes), de cellules à mucus beaucoup plus nombreuses que dans l'intestin grêle et de cellules entéroendocrines. Les cellules souches génèrent des cellules progénitrices lesquelles migrent le long de la crypte jusqu'à la surface épithéliale où elles se détachent et meurent par anoïkose dans la lumière intestinale.

## 2. Le facteur de transcription CDP

### 2.1 Généralités

La protéine CDP (CCAAT-displacement protein) est un facteur de transcription faisant partie de la famille des protéines à homéodomaine et présent chez tous les métazoaires (Nepveu, 2001). Au niveau du système gastro-intestinal, cette protéine ubiquitaire (Luong *et al.*, 2002) est détectée dans l'épithélium de l'iléon et du côlon proximal chez la souris adulte (Boudreau *et al.*, 2002). Chez l'humain, le gène codant pour la protéine CDP, *CUTL1*, est localisé au niveau de la bande 7q22 sur le chromosome 7 (Scherer *et al.*, 1993; Lemieux *et al.*, 1994). L'ADN<sub>c</sub> humain a une taille de 5.3 kb et encode pour un polypeptide de 1505 acides aminés (Neufeld *et al.*, 1992). L'activité de déplacement «CCAAT» de CDP a originalement été identifiée chez le vertébré oursin de mer vert *Psammechinus miliaris* (Barberis *et al.*, 1987). L'absence d'expression du gène du sperme de l'histone H2B-1 dans tous les organes exceptés les testicules s'explique par la présence d'un facteur (CDP) capable de déplacer le facteur ubiquitaire CBF (*CCAAT binding factor*) du promoteur du gène de l'histone H2B-1. Par conséquent, ce gène est exclusivement exprimé dans les



testicules de *Psammechinus miliaris*. Les premières études de la fonction de CDP ont été réalisées chez la mouche *Drosophila melanogaster* (pour une revue, Nepveu, 2001). L'homologue Cut chez la Drosophile est exprimé dans plusieurs tissus et organes chez l'embryon et l'adulte tels que le système nerveux central et périphérique, les tubules Malphigian, les ailes, les pattes et l'abdomen. Des études génétiques effectuées chez la Drosophile ont révélé l'existence de deux classes de mutations viables de Cut, soient *kinked femur* (kf) et *cut wing* (ct) causant une malformation dans le fémur et dans l'aile respectivement. Ces études ont permis de démontrer que Cut joue non seulement un rôle dans le développement de ces organes, mais aussi dans le maintien du phénotype à l'état différencié. De plus, Cut est aussi impliqué dans la détermination cellulaire. En effet, dans le système nerveux périphérique, son expression dans la dernière étape du processus de neurogénèse informe la cellule neuronale précurseur de se diviser et de se différencier en organe sensoriel externe. Une mutation létale de Cut dans l'embryon de *Drosophila melanogaster* mène à une transformation des organes sensoriels externes en organes sensoriels internes.

## 2.2 Domaines de la protéine CDP

La protéine CDP est une protéine très bien conservée dans l'évolution; l'ADN<sub>c</sub> a été isolé de plusieurs espèces incluant la souris (Valarche *et al.*, 1993), le rat (Yoon et Chikaraishi, 1994), le chien (Andres *et al.*, 1992) et le poulet (Quaggin *et al.*, 1996; Tavares *et al.*, 2000) et qui a été respectivement appelé Cux-1 (*Cut homeobox*), CDP-2, Clox (*Cut-like homeobox*) et Cux-2. Le facteur de transcription CDP est une protéine de 200 kDa qui contient quatre domaines de liaison à l'ADN : trois Cut repeat (CR1, CR2 et CR3) très bien conservés entre les espèces et un Cut homéodomaine

(HD) qui confère à CDP la spécificité de reconnaissance d'une séquence d'ADN particulière (Harada *et al.*, 1994). À l'extrémité N-terminale, il y a un domaine d'interaction protéine/protéine, le domaine «coiled-coil» (Gupta *et al.*, 2003) et à l'extrémité C-terminale se trouve le domaine de répression actif de CDP qui contient plus spécifiquement les régions R1 et R2 qui ont été démontrées comme étant les régions responsables de la répression active (Mailly *et al.*, 1996) (Figure 2). Originellement, des études utilisant des protéines de fusion GST (glutathione S-transférase) ont démontré que les Cut repeat et l'homéodomaine pouvaient lier l'ADN avec grande affinité sous forme de monomère (Harada *et al.*, 1994). Cependant, puisque les protéines de fusion GST existent sous forme de dimères (Harada *et al.*, 1995), d'autres études utilisant des protéines de fusion étiquetées avec une étiquette histidine ont démontré que les quatre domaines de liaison à l'ADN de CDP étaient incapables de lier l'ADN avec grande affinité de façon individuelle (Moon *et al.*, 2000). Les Cut repeat et l'homéodomaine s'associent donc ensemble par des interactions intramoléculaires pour former différentes combinaisons de domaines lesquelles lient l'ADN avec une affinité et une cinétique bien distinctes. Le dimère CR1CR2 se lie à deux séquences répétées C(A/G)AT qu'elles soient directes ou inversées et séparées par un nombre variable de nucléotides. Il présente une cinétique de liaison à l'ADN transitoire appelée «on and off», c'est-à-dire qu'une fois lié à l'ADN, il s'en détache aussi rapidement. CR1CR2 possède également l'activité de déplacement «CCAAT». Il se lie au motif CCAAT et son affinité à l'ADN est augmentée lorsqu'une séquence C(A/G)AT se trouve à proximité. Les autres combinaisons de domaines (CR1HD, CR2HD, CR3HD et CR2CR3HD) possèdent une forte affinité pour l'ADN et s'y lient de façon plus stable. Elles reconnaissent la séquence consensus ATCGAT (Moon *et al.*, 2000) (Figure 3).

**Figure 2. Les domaines fonctionnels de la protéine CDP.** Le facteur CDP possède quatre domaines de liaison à l'ADN : trois Cut repeat CR1, CR2 et CR3 et un Cut homéodomaine (HD). Un domaine d'interaction protéine/protéine « coiled-coil » se trouve à l'extrémité N-terminale et des domaines de répression actifs R1 et R2 à l'extrémité C-terminale de la protéine.

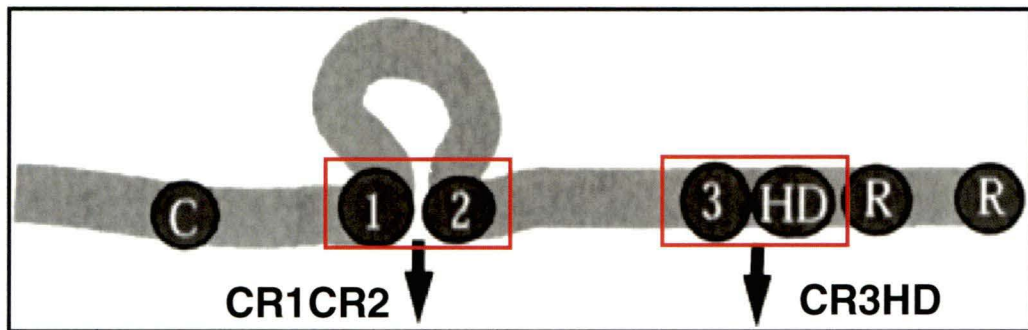


### 2.3 Activité de répression transcriptionnelle de CDP

La fonction primaire de CDP au niveau de l'ADN est de réprimer la transcription des gènes cibles, c'est donc un répresseur transcriptionnel (Dufort et Nepveu, 1994; Coqueret *et al.*, 1998; van Gurp *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2003). Plusieurs de ses cibles sont des gènes réprimés dans les cellules prolifératives précurseurs, mais qui deviennent rapidement exprimés quand les cellules se différencient et lorsque l'activité de liaison de CDP à l'ADN cesse (van Gurp *et al.*, 1999; Nepveu, 2001). Des études ont également démontré un rôle de CDP dans la répression colonique du gène de la sucrase-isomaltase (SI) durant le développement post-natal chez la souris (Boudreau *et al.*, 2002). CDP peut réprimer la transcription des gènes via deux mécanismes : d'abord, CDP peut empêcher des activateurs de la transcription comme le facteur CBF (*CCAAT binding factor*) de se lier à l'ADN et ainsi activer la transcription des gènes cibles. C'est la répression passive, car il y a compétition entre un répresseur (CDP) et un activateur (CBF) (Mailly *et al.*, 1996). CDP peut également réprimer la transcription de façon active en se liant fermement au promoteur de ses gènes cibles via ses deux domaines de répression actifs (Mailly *et al.*, 1996). Ainsi, CDP peut, via son Cut homéodomaine, recruter des histones déacétylases telles HDAC-1 (Li *et al.*, 1999) qui vont coopérer avec lui dans la répression transcriptionnelle.

La transcription des gènes est un événement très complexe qui est modulée par des activateurs et des répresseurs de la transcription, mais aussi par une multitude de modifications post-traductionnelles sur les facteurs de transcription ou encore directement sur la chromatine. Les facteurs de transcription peuvent recruter des

**Figure 3. Séquences consensus de liaison des dimères de domaines de CDP.** Le dimère CR1CR2 possède l'activité de déplacement « CCAAT » de CDP et se lie sur deux séquences répétées C(A/G)AT directes ou inversées séparées par un nombre variable de nucléotides. Le dimère CR3HD reconnaît la séquence consensus ATCGAT et résulte en une interaction stable avec l'ADN (figure tirée de la revue Nepveu (2001) Gene p.1-15).



**C(A/G)AT (n) C(A/G)AT ATCGAT ou ATCAAT**

Diagram showing two DNA strands with red arrows indicating binding sites. The first strand has two binding sites for C(A/G)AT, and the second strand has one binding site for ATCGAT or ATCAAT.

- Faible affinité pour l'ADN
- Liaison transitoire à l'ADN
- Possède une activité de déplacement *CCAAT*
- Forte affinité pour l'ADN
- Interaction stable avec l'ADN

complexes protéiques altérant les nucléosomes tels les HAT et les HDAC. Les complexes HAT sont des histones acétyltransférases responsables de l'activation de la transcription des gènes et les complexes HDAC sont des histones déacétylases dont la fonction primaire est de réprimer la transcription des gènes cibles (Cosma, 2002; Orphanides et Reinberg, 2002; Lusser et Kadonaga, 2003; Kadonaga, 2004). CDP est un de ces facteurs de transcription dont l'activité de répression transcriptionnelle est régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles. En effet, CDP compétitionne avec des activateurs de la transcription soient ATF-1 (*activating transcription factor 1*) et GCN5 (histone acétyltransférase) dans la répression du gène CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*) (Li *et al.*, 1999). Cette répression est médiée grâce au recrutement d'un complexe HDAC (histone déacétylase) via les domaines CR3 et HD de CDP sur la boîte Y du promoteur CFTR. Il a également été mis en évidence que l'activité histone acétyltransférase du co-activateur PCAF (*p300/CBP-associated factor*) joue un rôle important dans la répression transcriptionnelle de CDP (Li *et al.*, 2000). PCAF acétyle les domaines de liaison CR3 et HD de CDP inhibant ainsi son activité de liaison à l'ADN et, par conséquent, son activité de répresseur transcriptionnel. Des études effectuées en 2004 par l'équipe de Walsh ont démontré un mécanisme unique de répression transcriptionnelle par CDP : le recrutement d'une activité histone lysine méthyltransférase (HKMT) sur le promoteur du gène p21 (Nishio et Walsh, 2004). Suite au recrutement de l'histone lysine méthyltransférase G9a sur le promoteur du gène p21, celle-ci ajoute spécifiquement des méthyles sur les lysines 9 de l'histone H3 et coopère, avec CDP, dans la répression transcriptionnelle du gène p21.



## 2.4 Cycle cellulaire et CDP

Plusieurs évidences de la littérature ont également démontré que CDP interagit avec des partenaires du cycle cellulaire pour inhiber l'expression de ses gènes cibles. Des études *in vitro* ont établi que CDP réprime la transcription d'un gène impliqué dans la différenciation des ostéoblastes, le gène de l'ostéocalcine (OC) (van Gurp *et al.*, 1999). CDP forme un complexe protéique composé de la cycline A et d'un homologue de la protéine du rétinoblastome (pRb) p107, sur la boîte OC I du promoteur du gène de l'ostéocalcine. L'activité de liaison de ce complexe d'interaction protéines/ADN est restreinte aux cellules prolifératives, car elle disparaît lorsque les cellules se différencient. Ceci renforce le rôle joué par CDP comme répresseur de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation. Le facteur CDP régule également l'expression des gènes histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 durant la transition G1/S du cycle cellulaire (el-Hodiri et Perry, 1995; van Wijnen *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2003). Il représente la sous-unité liant l'ADN (van Wijnen *et al.*, 1996) dans l'immense complexe protéique HiNF-D (*histone nuclear factor D*) composé de la cycline A, de Cdk1 (Cdc2) (*cyclin-dependent kinase*) et d'un homologue de la protéine pRb (van Wijnen *et al.*, 1994). Plus spécifiquement, des études effectuées dans des cellules présentant des caractéristiques normales de croissance, soit la lignée fibroblastique de souris NIH 3T3, ont mis en évidence une implication de CDP dans la répression du gène de l'histone H4 à la fin de la phase S (Gupta *et al.*, 2003). En effet, lorsque la réplication de l'ADN est terminée, CDP interagit de façon stable avec les protéines du complexe HiNF-D, soit la cycline A, Cdk-1 (Cdc-2) et pRB (p105) sur le site II du promoteur du gène de l'histone H4.

Cependant, seulement la protéine Rb coopère avec CDP dans la répression transcriptionnelle du gène de l'histone H4 à la fin de la phase S.

## 2.5 Activité de liaison de CDP à l'ADN pendant le cycle cellulaire

D'autres modifications post-traductionnelles sont à l'origine de la régulation de l'activité de répression transcriptionnelle de CDP. En effet, le facteur CDP possède des sites consensus de phosphorylation pour deux kinases, soit la protéine kinase C (PKC) (Coqueret *et al.*, 1996) et la caséine kinase II (CKII) (Coqueret *et al.*, 1998). Toutes deux phosphorylent spécifiquement des acides aminés localisés dans les CR1, 2 et 3 de CDP inhibant ainsi son activité de liaison à l'ADN et, par conséquent, sa capacité à réprimer l'expression de ses gènes cibles (Coqueret *et al.*, 1996; Coqueret *et al.*, 1998). L'activité de liaison à l'ADN de CDP est également modulée pendant les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, elle est très faible dans les phases G<sub>0</sub> et début G<sub>1</sub> du cycle cellulaire, elle s'intensifie vers la fin de la phase G<sub>1</sub> jusqu'à la phase S (Coqueret *et al.*, 1998) et elle diminue plus les cellules progressent dans la phase G<sub>2</sub> (Santaguida *et al.*, 2001). Il s'en suit donc que l'activité de liaison de CDP à l'ADN dépend de son état de phosphorylation. En effet, la protéine CDP est phosphorylée dans les phases G<sub>0</sub> et début G<sub>1</sub> du cycle cellulaire diminuant ainsi son activité de liaison à l'ADN. Des études ont prouvé que les protéines kinases PKC et CKII ne sont pas responsables de la diminution de l'activité de liaison de CDP à l'ADN durant les phases G<sub>0</sub> et début G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Coqueret *et al.*, 1998). Une molécule CR3HD dans laquelle les sites de phosphorylation pour la PKC et la CKII ont été mutés montre la même activité de liaison de CDP à l'ADN en comparaison avec la molécule de type sauvage. Ceci indique que la régulation de

l'activité de liaison de CDP à l'ADN dans les phases G<sub>0</sub> et début G<sub>1</sub> du cycle cellulaire implique d'autres sites de phosphorylation et d'autres kinases. Pendant la phase S du cycle cellulaire, la phosphatase à double spécificité Cdc25A (laquelle devient active à la fin de la phase G<sub>1</sub> (Hoffmann *et al.*, 1994)) déphosphoryle CDP. Ceci résulte en une augmentation de l'activité de liaison de CDP à l'ADN et en une diminution de l'expression du gène p21, gène qui joue un rôle important dans l'arrêt des cellules en phase G<sub>1</sub> en réponse à des dommages à l'ADN (Li *et al.*, 1994; Michieli *et al.*, 1994; Sheikh *et al.*, 1994; Coqueret *et al.*, 1998). Un autre événement majeur se produit dans la phase S du cycle cellulaire et contribue à moduler l'activité de liaison de CDP à l'ADN. La protéine complète de 200 kDa qui montre une cinétique semblable au dimère CR1CR2, c'est-à-dire qui se lie de façon transitoire à l'ADN, est clivée en protéine tronquée en N-terminal d'un poids moléculaire de 110 kDa (Moon *et al.*, 2001). Cette nouvelle isoforme de CDP, dont la nomenclature est CDP p110, est composée des domaines de liaison CR2, CR3 et HD et possède une forte affinité pour l'ADN. Le clivage protéolytique de CDP p200 a comme conséquence d'augmenter l'activité de liaison de CDP p110 à l'ADN et également de changer ses propriétés transcriptionnelles. En effet, il a été démontré que CDP p110 active l'expression du gène de l'ADN polymérase  $\alpha$  (Truscott *et al.*, 2003), enzyme responsable de la réplication de l'ADN dans la phase S (Pearson *et al.*, 1991). L'isoforme CDP p110 stimule aussi l'activité transcriptionnelle des promoteurs d'autres gènes dont l'expression est augmentée en phase S : dihydrofolate réductase (DHFR), carbamoyl-phosphate synthase-aspartate carbamoyltransférase-dihydroorotase (CAD) et la cycline A (Truscott *et al.*, 2003). Une des protéases responsables du clivage protéolytique de CDP p200 en CDP p110 à la transition G<sub>1</sub>/S est la cathepsin L (Goulet *et al.*, 2004). Plus spécifiquement, elle clive CDP p200 entre les domaines

CR1 et CR2 (Moon *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que le complexe cycline A/cdk2 est responsable de l'activité de liaison maximale à l'ADN de CDP p110 pendant la phase S du cycle cellulaire (Santaguida *et al.*, 2005). Ce complexe est incapable de phosphoryler CDP p110 sur la sérine 1237. Donc, cette isoforme peut efficacement lier l'ADN et activer l'expression de l'ADN polymérase  $\alpha$ . Pendant la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire, le complexe cycline A/cdk1 présent et actif dans cette phase phosphoryle les résidus sérines 1237 et 1270 des domaines CR3 et HD de CDP diminuant ainsi son activité de liaison à l'ADN (Santaguida *et al.*, 2001). CDP perd donc la capacité de lier le promoteur du gène p21 et d'inhiber son expression. Enfin, un autre phénomène contribue également à réguler l'activité de liaison de CDP à l'ADN. L'extrémité N-terminale de CDP a la particularité de fonctionner comme un domaine auto-inhibiteur (Truscott *et al.*, 2004). Le domaine N-terminal inhibe la liaison de la protéine complète CDP à l'ADN. CDP perd ainsi la capacité d'activer l'expression de l'ADN polymérase  $\alpha$ .

## 2.6 Rôles de CDP *in vivo*

Plusieurs altérations du gène *Cutl1* ont été effectuées chez la souris dans le but de comprendre le rôle de cette protéine *in vivo*. Une mutation dans les domaines CR3 et HD du gène *Cutl1* a été effectuée par insertion d'une cassette néomycine menant à un hypomorphisme, c'est-à-dire à la production d'une protéine altérée (Ellis *et al.*, 2001). Cette mutation produit une protéine tronquée qui demeure majoritairement dans le cytoplasme et qui perd la capacité de réprimer la transcription de ses gènes cibles. Les souris homozygotes mutantes meurent après la naissance dû à un problème respiratoire. Les quelques souris qui survivent présentent un retard de croissance

sévère qui n'est pas causé par une dysfonction de la glande thyroïde ou de la glande hypophyse (Ellis *et al.*, 2001) et qui n'est pas dû à un développement anormal de l'intestin grêle pouvant entraîner une malabsorption des nutriments (Luong *et al.*, 2002). Les souris mutantes CDP présentent un retard dans la maturation de l'épithélium du poumon. En effet, à la naissance, l'épithélium du poumon des souris mutantes pour CDP est mince et non fonctionnel et est composé exclusivement de cellules précurseurs cuboïdales. Ceci montre que la protéine CDP joue un rôle essentiel dans la différenciation de l'épithélium du poumon (Ellis *et al.*, 2001). Le développement du follicule du poil est également affecté chez les souris CDP homozygotes mutantes (Ellis *et al.*, 2001). Il y a une réduction dans le nombre de couches de cellules composant la racine de la gaine intérieure du follicule du poil (IRS : *inner root sheath*) qui supporte la croissance normale de la fibre du poil. La différenciation terminale des cellules progénitrices en une des sept lignées cellulaires du follicule du poil est également affectée. Une mutation dans le domaine de liaison HD résulte en une réduction considérable de la taille des souris CDP mutantes (Sinclair *et al.*, 2001; Luong *et al.*, 2002) et en une diminution dramatique de la grosseur et de la composition cellulaire du thymus (Sinclair *et al.*, 2001). En effet, il y a une réduction dans le nombre de lymphocytes B et T dans la moëlle osseuse et dans le thymus due à une augmentation de l'apoptose de ces cellules causée par une surexpression du facteur nécrosant TNF (*tumor necrosis factor*). Une augmentation du nombre de cellules myéloïdes (hyperplasie myéloïde) dans le foie, la moëlle osseuse et le sang périphérique a également été observée. Les souris mutantes pour le domaine HD de CDP sont également plus susceptibles aux infections bactériennes, elles souffrent de rhinites purulentes pouvant perturber le sens de l'odorat et les mâles sont infertiles (Luong *et al.*, 2002). CDP joue donc un rôle essentiel dans le

développement normal des tissus, dans la reproduction et dans l'habileté à résister aux infections microbiennes. Enfin, une mutation dans le domaine de liaison CR1 résultant en la production d'une protéine mutante dans laquelle il y a une délétion dans le domaine CR1, mais dont la région en C-terminale est intacte, garde la capacité de lier l'ADN (Tufarelli *et al.*, 1998).

### 3. Le facteur de transcription PLZF

#### 3.1 Généralités

La protéine PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) est un facteur de transcription de 81 kDa (Chen *et al.*, 1993) composé de deux domaines de répression : un domaine BTB/POZ (*bric-à-brac, tramtrack, brad complex/poxvirus zinc finger*) à l'extrémité N-terminale et un domaine RD2 (Melnick *et al.*, 2000). Le domaine BTB/POZ permet à PLZF de s'homo- et de s'hétérodimériser conférant ainsi à la protéine la capacité de s'associer et de former des hétérodimères avec d'autres protéines possédant le même domaine (Hoatlin *et al.*, 1999). C'est également via ce domaine que PLZF recrute des co-répresseurs nucléaires tels SMRT, N-CoR (Hong *et al.*, 1997), mSin3a (David *et al.*, 1998) et HDAC (Grignani *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998) lui permettant ainsi d'exercer son rôle de répresseur transcriptionnel. À l'extrémité C-terminale se trouve le domaine de liaison à l'ADN de PLZF composé de neuf doigts de zinc Krüppel liant la séquence consensus GTACAGTTSCAU (Ball *et al.*, 1999). Il a été démontré que les deux premiers doigts de zinc ne sont pas nécessaires à la liaison de PLZF à l'ADN (Li *et al.*, 1997; Sitterlin *et al.*, 1997). Enfin, dans la partie centrale de la protéine, il y a un domaine riche en prolines et un

domaine acide (Martin *et al.*, 2003). Initialement, PLZF a été découvert comme protéine de fusion au récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque RAR $\alpha$  (*retinoic acid receptor*) suite à la translocation chromosomique t(11;17)(q23;q21) chez des patients atteints d'une forme de leucémie appelée la leucémie promyélocytique aiguë (APL : *acute promyelocytic leukemia*) (Chen *et al.*, 1993). Dans ce type de leucémie, la translocation résulte en la production de deux nouvelles protéines chimériques ayant des activités différentes : le dimère PLZF-RAR $\alpha$  dans lequel le domaine d'activation de RAR $\alpha$  est remplacé par le domaine de répression BTB/POZ de PLZF et le dimère RAR $\alpha$ -PLZF dans lequel sept des neuf doigts de zinc de PLZF sont fusionnés au domaine d'activation retrouvé à l'extrémité N-terminale de RAR $\alpha$  (Chen *et al.*, 1993; Melnick *et al.*, 1999). Des évidences dans la littérature ont montré que PLZF inhibe la prolifération cellulaire en réprimant l'expression de deux de ses gènes cibles, soient c-myc (McConnell *et al.*, 2003) et la cycline A2 (Yeyati *et al.*, 1999).

#### 4. Hypothèse du projet de recherche et objectifs

Le facteur de transcription CDP est donc un répresseur transcriptionnel de nombreux gènes directement impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Dufort et Nepveu, 1994; van Wijnen *et al.*, 1996; Coqueret *et al.*, 1998). Dans le contexte de l'épithélium intestinal, des études ont identifié CDP comme étant le répresseur colonique du gène de la sucrase-isomaltase (SI) (Boudreau *et al.*, 2002). Cependant, aucun rôle physiologique n'a été attribué pour ce facteur dans le contexte de l'épithélium colonique. Mon hypothèse de recherche est que le facteur de transcription CDP soit impliqué dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle de

l'épithélium colonique. Deux objectifs généraux ont été établis afin de vérifier cette hypothèse de recherche :

(1) Identifier des gènes cibles de CDP dans le côlon par l'utilisation de souris CDP mutantes pour le domaine HD. Des micropuces à ADN ont permis d'identifier PLZF comme étant un gène dont l'expression était la plus augmentée dans le côlon des souris déficientes en CDP. L'objectif est donc de caractériser l'interaction entre le facteur de transcription CDP et le gène PLZF dans l'épithélium colonique. Les objectifs spécifiques sont :

- a) Déterminer l'effet de CDP sur l'activité transcriptionnelle du gène PLZF;
- b) Identifier les sites potentiels d'interaction de CDP avec le gène PLZF et
- c) Déterminer le profil d'expression de CDP et de PLZF dans différentes lignées cancéreuses colorectales humaines.

(2) Établir des lignées cancéreuses colorectales humaines qui surexpriment de façon stable la protéine CDP afin d'approfondir le rôle potentiel de CDP dans les mécanismes menant à la progression du cancer colorectal. Les objectifs spécifiques sont:

- a) Établir des lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain qui surexpriment la protéine CDP;
- b) Déterminer le rôle de CDP dans le comportement prolifératif des lignées qui surexpriment CDP;



- c) Déterminer les voies impliquées dans le clivage protéolytique de CDP dans le côlon et
- d) Déterminer le profil d'expression de CDP dans les polypes coloniques de souris APC/Min.

## II-Matériel et méthodes

### 1. Le modèle murin CDP $\Delta$ HD

Les souris mutantes pour la protéine CDP (CDP  $\Delta$ HD) ont été générées par le groupe de Sinclair et collaborateurs en 2001 (Sinclair *et al.*, 2001). L'utilisation de ce modèle a permis d'effectuer les micropuces à ADN et de valider une augmentation des niveaux d'expression du messager de PLZF obtenue par ces micropuces en PCR quantitatif en temps réel. Brièvement, la mutation dans le domaine HD de CDP a été effectuée par insertion d'une cassette néomycine à l'intérieur des exons 20 et 21 du domaine HD du gène CDP. La présence d'un codon STOP à l'intérieur de la cassette néomycine a mené à un hypomorphisme, c'est-à-dire à la production d'une protéine altérée (Figure 4A). Les souris CDP mutantes sont beaucoup plus petites en taille et présentent un problème au niveau du développement du follicule du poil (Figure 4B).

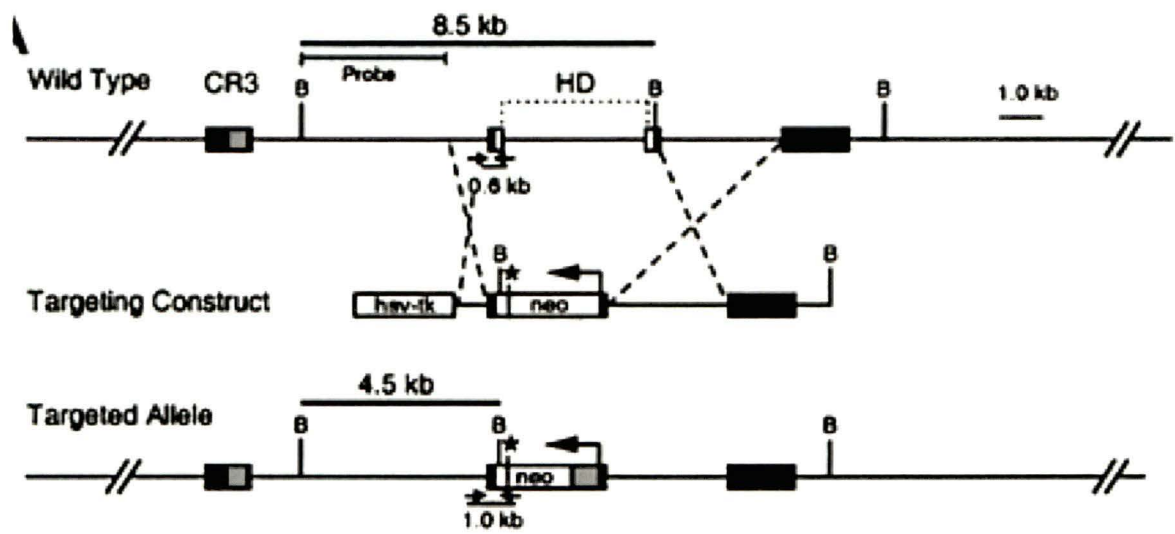
### 2. Culture cellulaire

#### 2.1 Cellules 293T

La lignée cellulaire 293T est une lignée foétale humaine transformée de reins. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum bovin foetal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100  $\mu$ g/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

**Figure 4. Génération des souris mutantes CDP  $\Delta$ HD.** (A) La mutation a été effectuée suite à l'insertion d'une cassette néomycine dans le domaine HD du gène CDP résultant en la production d'une protéine tronquée. (B) Comparaison entre une souris hétérozygote (droite) et homozygote mutante (gauche) pour le domaine HD de CDP (figures tirées de Sinclair et al., (2001) Blood p.3658-3667).

A



B



## 2.2 Cellules HIEC

La lignée cellulaire HIEC (*human intestinal epithelial cells*) est une lignée humaine de cellules épithéliales intestinales de crypte (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

## 2.3 Cellules Caco 2/15

La lignée cellulaire Caco 2/15 est un clone de la lignée parentale Caco-2 (Beaulieu et Quaroni, 1991) (HTB27, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD). Les cellules cancéreuses provenaient d'un carcinome de côlon humain. Elles ont la particularité d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix avant l'atteinte de la confluence.

## 2.4 Cellules T84

Les cellules de la lignée T84 sont des cellules cancéreuses qui proviennent d'un adénocarcinome de côlon humain (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu HAM's : DMEM (1 : 1) (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

## 2.5 Cellules Colo 205

Les cellules de la lignée Colo 205 sont des cellules cancéreuses provenant d'un adénocarcinome de côlon humain (Semple *et al.*, 1978). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

## 2.6 Cellules DLD-1

Les cellules de la lignée DLD-1 sont des cellules cancéreuses qui proviennent d'un adénocarcinome de côlon humain (Dexter *et al.*, 1981). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Burlington, Ontario) en présence de 10% de

sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), 0,01M d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), à 37°C dans une atmosphère à 95% air et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé aux deux jours et les cellules ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

### **3. Traitement des cellules avec les inhibiteurs de protéases**

Les cellules des lignées stables et contrôles T84 et Colo 205 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. 24 heures suivant l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec 25µM de MG132 (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis) ou 50µM de calpeptine (EMD Biosciences, San Diego, États-Unis). Comme contrôle négatif, les cellules ont également été traitées avec le solvant ayant servi à diluer le MG132 et la calpeptine, soit le DMSO dans les deux cas. Les protéines totales ont été récoltées 18 heures après le traitement comme décrit à la section 7.1.1.

### **4. Préparation de la construction pGL3 basic/PLZF 3 kb 5'-UTR**

#### **4.1 Extraction de l'ADN génomique des cellules HIEC**

L'ADN génomique des cellules HIEC a été extrait en utilisant les colonnes QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Ontario) et selon la méthode décrite par le manufacturier. Après avoir rincé les cellules avec 5 ml de PBS 1X, elles ont été récupérées avec 1 ml de PBS 1X à l'aide d'un grattoir et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu avec 200 µl de PBS, traité avec 20 µl de protéinase K et 200 µl de tampon AL et incubé à 70 °C pendant 10 minutes. L'ADN a été précipité par ajout de 200 µl d'éthanol 100%. Le mélange de précipités ainsi formés a été déposé sur une colonne DNeasy préalablement placée

dans un tube collecteur de 2 ml. Après centrifugation à 8000 rpm pendant 1 minute, la colonne a été placée dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et 500 µl du premier tampon de lavage AW1 a été déposé sur la colonne. Elle a été centrifugée pendant 1 minute à 8000 rpm et de nouveau placée dans un autre tube collecteur de 2 ml. Un volume de 500 µl du deuxième tampon de lavage AW2 a été déposé sur la colonne et la membrane a été séchée en centrifugant à 13000 rpm pendant 3 minutes. La colonne a été placée dans un tube eppendorf de 1,5 ml et l'ADN a été élué en ajoutant 200 µl du tampon AE sur la membrane. La colonne a été incubée à la température de la pièce pendant 1 minute et centrifugée à 8000 rpm pendant 1 minute. L'élution a été répétée une seconde fois et l'ADN génomique ainsi extrait a été conservé à 4°C.

#### 4.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La majorité des régions du gène PLZF humain ont été amplifiées à partir de l'extrait d'ADN génomique des cellules HIEC par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Tableau 1 pour les conditions PCR). Dans le cadre de cette étude, c'est la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF humain qui a été utilisée.

Le mélange réactionnel de l'amplification était composé de 100 ng d'ADN génomique des cellules HIEC, de 5 µl de Tampon Herculase 10X (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie), de 0,8 µl d'un mélange de dNTP (25mM), de 100 ng de chacun des oligonucléotides, de 4% de DMSO, d'eau bidistillée stérile pour compléter le volume final à 50 µl et finalement de 2,5 U de la Herculase Hotstart DNA polymérase (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie). L'amplification de la portion d'ADN de 3 kb a été effectuée selon un gradient de températures et elle a été



**Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour amplifier les différentes régions du gène PLZF et conditions de PCR**

Régions	Amorces	Température d'appariement	Polymérase utilisée
3 kb 5'-UTR	3' HPLZF: 5'-GAGGGGAAGAAGCAAAAGAGA-3' (+) 2878 HPLZF: 5'-GATCCGGAGGCTTTGTACC-3'	57°C; 58,7°C	Herculase
2 kb	HPROPLZF-8: 5'-TTCCTCTGACTGCAGAAAGC-3' HPLZFP B1 : 5'TAAAAGCCCTTGCTTCCTTC-3'	58,7°C	Herculase
1.8 kb	HPROPLZF-3: 5'-CTTCTAGATTATGTAGCCTC-3' HPROPLZF-4: 5'-ATAGCTGACAGCGGTCAATG-3'	55°C	Herculase
2.9 kb	HPROPLZF-5: 5'-ATTGACCGCTGTCAGCTATC-3' HPROPLZF-6: 5'-CCAGCTCAGGTGTTATATCC-3'	57°C	Herculase

réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes; 10 cycles d'incubation alternative de 30 secondes à 95°C, 30 secondes de 55°C à 65°C (gradient de températures) et 3 minutes à 72°C; 20 cycles d'incubation alternative de 30 secondes à 95°C, 30 secondes de 55°C à 65°C (gradient de températures) et 3 minutes à 72°C avec une augmentation de l'élongation de 10 secondes par cycle et finalement une incubation de 7 minutes à 72°C. La réaction a été finalement refroidie à 4°C. Cette réaction de PCR par gradient de températures a permis l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN de 3 kb à des températures de 57°C et de 58.7°C.

#### 4.3 Sous-clonage des fragments amplifiés du gène PLZF dans le vecteur de transition pBluescript KS(-) et TOPO TA

Les régions de 2,9 kb, de 1,8 kb et de 3 kb ont été sous-clonées dans le vecteur pBluescript KS(-) et la région de 2 kb a été sous-clonée dans le vecteur de transition TOPO TA. Il sera question ici d'une description des manipulations effectuées pour le sous-clonage de la région étudiée dans ce mémoire, soit la portion de 3 kb 5'-UTR.

Suite à la migration du produit PCR sur gel d'agarose 1%, l'ADN a été extrait et purifié par utilisation des colonnes QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Ontario) selon les recommandations du manufacturier. Le fragment d'ADN a été phosphorylé à l'aide de la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs, Pickering, Ontario) puis inséré dans le vecteur de transition pBluescript-KS(-) préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction EcoRV (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) et déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). La ligation a été effectuée selon le protocole du *Rapid ligation kit* (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) et elle a été transformée dans des bactéries chimiquement compétentes DH5 $\alpha$ . La détermination des clones positifs suite à l'extraction de l'ADN plasmidique des différentes colonies obtenues a été réalisée en digérant l'ADN avec l'enzyme de restriction BamHI (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) pendant 1 heure à 37°C. L'intégrité de l'ADN d'un clone positif a été par la suite vérifiée par séquençage en utilisant le DNA Core de l'université de Calgary.

#### 4.4 Clonage du fragment de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF dans le vecteur luciférase pGL3basic

Un clone du vecteur pBluescript KS(-)/PLZF 3 kb 5'-UTR a été digéré avec les enzymes de restriction BamHI (Roche, Québec, Canada) et Kpn I (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) toute la nuit à 37°C. Puisque la taille du fragment à digérer (3 kb) était la même que celle du vecteur pBluescript KS(-) (3 kb), l'enzyme Pvu I (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) a été ajoutée à la réaction afin de digérer le vecteur en plusieurs petits fragments d'une longueur inférieure à 3 kb. En parallèle, le vecteur luciférase pGL3 basic a été digéré avec les enzymes Kpn I (Roche

Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada) et Bgl II (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada) pendant 2 heures à 37°C. Le fragment d'ADN PLZF 3 kb 5'-UTR obtenu a été extrait et purifié en utilisant les colonnes QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Ontario) et selon le protocole du manufacturier. Suite à la digestion du vecteur luciférase pGL3 basic, un volume de phénol-chloroforme a été ajouté afin de se débarrasser de l'enzyme. Après centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, 10% d'acétate de sodium 3M pH 5.2 a été ajouté au surnageant puis deux volumes d'éthanol 100% froid. L'ADN a été précipité pendant 30 minutes à -80°C et ensuite centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes. Le culot d'ADN a été lavé avec 200 µl d'éthanol 70% à la température de la pièce, centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 minutes, le surplus d'éthanol a été enlevé et le culot d'ADN a été de nouveau centrifugé pendant 3 minutes. L'ADN a été séché à 37°C pendant 5 minutes et resuspendu dans de l'eau bidistillée stérile. Le vecteur ouvert pGL3 basic a été par la suite déphosphorylé pendant une heure à 37°C avec la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada). Afin de s'assurer de l'intégrité du vecteur d'ADN déphosphorylé, il a été migré sur gel d'agarose 1%, électroélué à 80 Volts pendant une heure dans du tampon TAE 1X (40mM de Tris-Acétate, 1mM de EDTA) suivi d'une précipitation au phénol-chloroforme et à l'acétate de sodium. Le fragment PLZF 3 kb 5'UTR a été inséré dans le vecteur pGL3 basic grâce à une ligation concentrée des extrémités cohésives du fragment et du vecteur par l'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs, Pickering, Ontario). La ligation a été transformée dans les bactéries électrocompétentes DH10β et les clones positifs ont été déterminés par digestion de l'ADN plasmidique avec l'enzyme de restriction Nco I (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada). Il a donc été possible d'obtenir le vecteur luciférase pGL3basic/PLZF 3 kb 5'-UTR.

## 5. Essais luciférase

### 5.1 Préparation des cellules

Les cellules 293T et les cellules cancéreuses colorectales humaines T84 ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits afin d'être à environ 90% confluentes le jour de la transfection. Chaque condition fut évaluée en triplicata. Les expériences ont été répétées trois fois de façon indépendante.

### 5.2 Transfection transitoire

#### 5.2.1. Préparation des ADNs

Un total de 0,8 µg d'ADN par puit a été transfecté dont 0,2 µg du vecteur luciférase pGL3 basic/PLZF 3 kb 5'-UTR, 0 ou 0,4 µg des vecteurs d'expression CMV-Cux ou pEGFP-CDP pour les cellules 293T et 0 ou 0,2 µg du vecteur d'expression pEGFP-CDP pour les cellules T84 et une quantité complémentaire du vecteur pcDNA 3.1néo afin de compléter à 0,8 µg. 0,6 ng du vecteur pRL SV40-Rénilla (Proméga, Madison, États-Unis) (2 ng/µl) a été ajouté à chaque mélange d'ADN pour évaluer l'efficacité de transfection dans chacun des puits.

#### 5.2.2 La transfection

2 µl/puit de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario) a été pré-incubé à 50 µl/puit du milieu OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Ontario) pendant 5 minutes à la température de la pièce. L'ADN a été pré-incubé dans 150 µl d'OptiMEM. Suite à la pré-incubation, 150 µl du mélange Lipofectamine 2000/OptiMEM a été ajouté à chaque tube d'ADN/OptiMEM et l'incubation a été poursuivie pendant 15 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des cellules 293T et T84 a été remplacé par 500 µl de milieu OptiMEM et 100 µl du mélange ADN/Lipofectamine

2000/OptiMEM a été ajouté goutte à goutte dans chaque puit. Les cellules ont été incubées toute la nuit à 37 °C. 24 heures après la transfection, le milieu OptiMEM a été remplacé par 500 µl du milieu DMEM 10% FBS et du milieu Ham's : DMEM 10% FBS pour les cellules 293T et T84 respectivement.

### 5.3 Lyse des cellules et essai luciférase

48 heures après la transfection cellulaire transitoire, le milieu est retiré, les cellules sont lavées dans 1 ml de PBS 1X (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et elles sont lysées dans 100 µl de tampon de lyse passif 1X (PLB : *passive lysis buffer*) (Proméga, Madison, États-Unis). Les cellules sont laissées sur la plaque agitatrice pendant 15 minutes. Les lysats de cellules sont resuspendus 5 fois, transférés dans un eppendorf et centrifugés à 4 °C pendant 5 minutes à 13 000 rpm. Un volume de 10 µl d'extraits protéiques est utilisé pour la lecture. La solution contenant le substrat pour la luciférase (LAR II : *Luciferase Assay Substrate*) (Proméga, Madison, États-Unis) ainsi que le tampon *Stop'n'Glow* (Proméga, Madison, États-Unis) contenant le substrat pour la Rénilla sont préparés et l'activité Luciférase est immédiatement mesurée de façon automatique par l'utilisation du luminomètre de marque Microplate Luminometer ORION (Berthold Detection Systems) selon le protocole suivant : première injection de 50 µl du substrat pour la luciférase (LAR II) suivi d'un délai de trois secondes; la première mesure est prise pendant dix secondes et il y a un délai de dix secondes permettant au signal de lumière de s'éteindre complètement. Il y a ensuite injection de 50 µl du substrat pour la Rénilla (tampon *Stop'n'Glow*), délai de trois secondes puis la deuxième mesure est prise pendant dix secondes.

## **6. Activité de liaison du facteur de transcription CDP à l'ADN**

### **6.1 Préparation des oligonucléotides pour les sondes radioactives**

Les oligonucléotides complémentaires correspondant aux 8 sites de liaison du facteur CDP dans la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF ont d'abord été synthétisés (Invitrogen, Burlington, Ontario) (Tableau 2). 25 µg de chaque oligonucléotide ont été mélangés et le volume a été complété à 50 µl avec de l'eau stérile. Les oligonucléotides ont été chauffés pendant 2 minutes à 75 °C et la réaction d'appariement a été effectuée en laissant descendre la température jusqu'à la température de la pièce (23°C). Les oligonucléotides double brins ont été dilués à 100 ng/µl puis marqués radioactivement à leur extrémité 5' dans une réaction d'échange du groupement phosphate avec le [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP par la T4 polynucléotide kinase (voir les protocoles décrits par Sambrook et al., 1998). Les sondes ont été purifiées en utilisant les colonnes ProbeQuant<sup>TM</sup> G50 (Amersham Biosciences, Québec, Canada) selon le protocole du manufacturier.

**Tableau 2. Séquences des oligonucléotides utilisés pour le gel de rétention**

	Oligonucléotides
CDP 1 9529-9545	5'-ACA GCC AAA AGA ATG -3' 3'-TGT CGG TTT TCT TAC -5'
CDP 2 9807-9823	5'-CCA ATA TTG CAG TGA A-3' 3'-GGT TAT AAC GTC ACT T-5'
CDP 3 9814-9830	5'-ACA GCG ACC AAT ATT G-3' 3'-TGT CGC TGG TTA TAA C-5'
CDP 4 9908-9924	5'-CCT CTT ATT GAT CCC G-3' 3'-GGA GAA TAA CTA GGG C-3'
CDP 5 10005-10021	5'-GCT GGA AGT GAT ATT G-3' 3'-CGA CCT TCA CTA TAA C-5'
CDP 6 10148-10164	5'-CCA TAG TTA AAT ATG G-3' 3'-GGT ATC AAT TTA TAC C-5'
CDP 7 10657-10673	5'-AGC CTC AAA GTT ATT G-3' 3'-TCG GAG TTT CAA TAA C-5'
CDP 8 10846-10862	5'-CCA CAG AAA TCT ATG G-3' 3'-GGT GTC TTT AGA TAC C-5'

## 6.2 Réaction de liaison à l'ADN et gel de rétention

Les réactions de liaison à l'ADN ont été effectuées dans un volume total de 20 µl contenant 2 µl de protéines purifiées GST-CR3HD (Boudreau *et al.*, 2002), 4 µl de tampon de liaison 5X (1M Tris-Cl (pH 7.5), 1M MgCl<sub>2</sub>, 3M KCl, 0,5M EDTA et 1M de DTT) et 50 ng de compétiteurs non spécifiques dIdC (Amersham Biosciences, Québec, Canada). 330 ng de la sonde (50 000 cpm) a été ajouté aux réactions et elles ont été incubées pendant 3 minutes à la température de la pièce. Les mélanges réactionnels ont été déposés sur un gel 5% acrylamide (4,8 g d'acrylamide, 0,128 g de bis-acrylamide, 9 ml de TBE 5X (0,04M Tris-borate, 0,04M acide borique, 0,5M EDTA pH 8.0), 200 µl d'ammonium persulfate 10%, 100 µl de TEMED et 80 ml

d'eau distillée) préalablement équilibré pendant 15 minutes à 25 mA dans un tampon TBE 0,5X. Le gel a été migré pendant 60 minutes à 150 Volts puis il a été séché pendant 1 heure à 80 °C avant d'être exposé dans une cassette d'exposition (*Kodak screen*) (Biorad, Mississauga, Ontario) toute la nuit. Le film a été révélé le lendemain à l'aide de l'appareil *Molecular Imager FX* (Biorad, Mississauga, Ontario).

## **7. Isolement des protéines et analyse Western**

### **7.1 Extraction des protéines totales**

#### **7.1.1 Des cellules**

Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X. Elles ont été récoltées avec un grattoir dans du tampon de lyse (*lysis buffer* : 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40 et 0,5% Na-déoxycolate) auquel a été ajouté juste avant l'extraction 1% du cocktail d'inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*) (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis), 200mM d'orthovanadate et 50mM de NaF. Les lysats cellulaires ont été incubés sur glace pendant 10 minutes et centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines totales ont été recueillies et conservées à -80 °C. Elles ont été dosées selon la méthode de Bradford (BioRad, Mississauga, Ontario) et la densité optique a été mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre (Biorad, Mississauga, Ontario).

#### **7.1.2 Du tissu fœtal humain (Matrisperse)**

Le segment de côlon d'un fœtus a été lavé dans du PBS 1X et coupé longitudinalement afin d'exposer l'épithélium intestinal humain. Il a été par la suite coupé en morceaux de 5mm et les morceaux ont été transférés dans un tube Falcon de 15 ml contenant 5 ml de la solution de Matrisperse (BD Biosciences, Mississauga,



Ontario). Ils ont été incubés à 4°C pendant 10 heures en ayant pris soin de placer les tubes à l'horizontal dans le but que tous les morceaux soient en contact avec la solution de Matrisperse. La solution de Matrisperse a été enlevée et 10 ml de PBS 1X a été ajouté aux morceaux. Le tube a été vigoureusement agité et la suspension de cellules épithéliales a été transférée dans un nouveau tube Falcon laissé sur glace en faisant attention de ne pas prendre les morceaux de côlon. L'ajout de PBS 1X et l'agitation se sont poursuivis jusqu'à ce que les cellules épithéliales ne se détachent plus (jusqu'à ce que la solution soit claire). Il y a eu récolte des protéines totales comme décrit à la section 7.1.1.

#### 7.1.3 Des polypes coloniques

Suite au sacrifice des souris, les polypes coloniques ont été extraites et mises dans un tube eppendorf de 2 ml contenant 500 µl de tampon de lyse (*lysis buffer* : 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40 et 0,5% Na-déoxycolate) additionné de 1% du cocktail d'inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*) (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis), 200mM d'orthovanadate et 50mM de NaF. Les polypes ont été homogénéisées à l'aide d'un polytron (Brinkmann instruments, Canada) jusqu'à ce que la solution soit claire. Les protéines totales ont été extraites comme décrit à la section 7.1.1.

#### 7.2 Immunobuvardage de type Western

Des gels précoulés NuPage 3-8% (Invitrogen, Burlington, Ontario) ont été utilisés pour la détection de la protéine CDP et des gels précoulés NuPage 4-12% (Invitrogen, Burlington, Ontario) pour la détection de la protéine PLZF.

### 7.2.1 Préparation des échantillons de protéines, migration et transfert

Une certaine quantité de protéines totales a été mélangée à de l'eau pour un volume total protéines/eau de 13 µl. Il y a eu ajout de 5 µl de Tampon 4X (Invitrogen, Burlington, Ontario) et 2 µl de DTT (*sample reducing agent*) (Invitrogen, Burlington, Ontario) et les échantillons ont été chauffés à 70 °C pendant 10 minutes. La migration a été effectuée pendant 2 heures à 150 Volts dans du tampon Tris-Acétate pH 8.24 (TA : 50mM Tricine, 50mM Tris base et 0,1% SDS) pour CDP et pendant 1 heure à 200 Volts dans du tampon MOPS pH 7.7 (50mM MOPS, 50mM Tris base, 0,1% SDS et 1mM EDTA) pour PLZF. Le poids moléculaire des protéines a été déterminé par comparaison à la migration d'un marqueur coloré (5 µl) (Rainbow Marker RPN 756, Amersham Biosciences, Québec, Canada). Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de nitrocellulose de type PVDF (préalablement activée dans du méthanol) (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada) pendant 2 heures à 30 Volts pour CDP et pendant 1 heure à 30 Volts pour PLZF dans un tampon de transfert pH 7.2 additionné d'antioxydant (Invitrogen, Burlington, Ontario) (25mM Bicine, 25mM Bis-Tris et 1mM EDTA). Le gel collé à la membrane de PVDF était pris en sandwich entre 2 papiers Whatman et quatre éponges. La membrane a été récupérée et a été lavée dans de l'eau ultrapure à la fin du transfert.

### 7.2.2 Détection des antigènes

Les sites antigéniques ont été bloqués dans du blotto 10% (lait écrémé Carnation dissout dans du PBS-Tween 0,1%) pendant toute la nuit à 4°C. La membrane a ensuite été incubée en présence des anticorps primaires dilués dans la solution de blocage (blotto 10%) (Tableau 3 pour les différentes dilutions) pendant 3 heures à la température de la pièce. Après deux lavages de 15 minutes dans du PBS-

Tween 0,1%, la membrane a été incubée pendant 45 minutes à la température de la pièce avec les anticorps secondaires dilués 1/3000 dans du blotto 10%. La membrane a été rincée trois fois dans du PBS-Tween 0,1% pendant 15 minutes. La membrane a été par la suite mise en présence de 3 ml du mélange réactionnel du kit ECL + (Amersham Biosciences, Québec, Canada) pendant 5 minutes à la température de la pièce puis transférée dans une cassette. Un film autoradiographique ECL (Amersham Biosciences, Québec, Canada) a été mis sur la membrane pendant un certain temps et révélé dans une chambre noire.

**Tableau 3. Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par transfert Western**

Nom Ac 1	Nature	Antigène	Dilution	Nom Ac 2	Dilution
CDP (C-20) (Santa Cruz, Californie, États-Unis)	Polyclonal  chèvre	Domaine C-terminal	1/250	Donkey anti-goat  (Santa Cruz, Californie, États-Unis)	1/3000
PLZF (EMD Biosciences, San Diego, États-Unis)	Polyclonal  souris	Protéine complète	1/250	Donkey anti-mouse  (Santa Cruz, Californie, États-Unis)	1/3000

## 8. Établissement des lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain

### 8.1 Production des rétrovirus

#### 8.1.1 Préparation des ADNs

15 µg de l'ADN rétroviral contenant les gènes nécessaires à la formation des capsides virales (gag, pol et env) et 15 µg du vecteur rétroviral (MSCVnéo EGFP-CDP et MSCVnéo pour le contrôle négatif) ont été mélangés sous l'enceinte de la salle de culture.

### 8.1.2 Transfection stable

Le mélange d'ADN a été transfecté dans la lignée cellulaire 293Tensemencée dans des boîtes de pétri de 100 mm selon la procédure suivante :

60 µl/puit de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario) a été pré-incubé à 750 µl/puit du milieu OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Ontario) pendant 5 minutes à la température de la pièce. L'ADN a été pré-incubé dans 750 µl d'OptiMEM. Suite à la pré-incubation, 750 µl du mélange Lipofectamine 2000/OptiMEM a été ajouté à chaque tube d'ADN/OptiMEM et l'incubation a été poursuivie pendant 20 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des 293T a été remplacé par 5 ml de milieu OptiMEM et 1,5 ml du mélange ADN/Lipofectamine 2000/OptiMEM a été ajouté goutte à goutte dans chaque boîte de pétri. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37°C et le milieu OptiMEM a été remplacé par 7 ml du milieu DMEM 10% FBS. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37°C.

### 8.1.3 Récolte des virus

Le milieu de culture contenant les virus en suspension a été prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml (BD Biosciences, Mississauga, Ontario) et filtré sur un filtre de 0,45 µm. Les particules virales récoltées ont été aliquotées et conservées à -80°C.

## 8.2 Infection des lignées cancéreuses colorectales humaines

1 ml de suspension virale contenant 1 µl de polybrène (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis) 4 µg/µl (concentration finale de 4 µg/ml) a été ajoutée sur les cellules HCT 116, DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 à 50% confluence etensemencées dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été incubées 1 heure à 37°C et 1 ml du milieu

approprié additionné de 1 µl de polybrène 4 µg/µl a été ajouté à chacun des puits. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37°C.

### 8.3 La sélection

Les cellules ont été décollées avec 0,5 ml de trypsine (Gibco BRL, Burlington, Ontario) à 37°C, puis transférées dans une boîte de pétri de 100 mm. La sélection a été effectuée avec le milieu de culture respectif additionné de l'antibiotique G418 (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis) à une concentration de 1 mg/ml. La sélection s'est poursuivie jusqu'à ce que les cellules non infectées et traitées avec le G418 soient entièrement mortes. Le milieu a été changé à tous les 2 jours en prenant soin de préparer du milieu frais contenant l'antibiotique à chaque fois et elles ont été réensemencées dans un ratio de un pour dix à l'atteinte de la confluence.

## 9. Décompte cellulaire

### 9.1 Préparation des cellules

Un nombre de 500 000 cellules des lignées stables Caco 2/15 qui surexpriment CDP et les cellules contrôles ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits permettant un dénombrement de trois à quatre échantillons et selon les conditions suivantes : à 70 % confluence, + 2 jours, + 6 jours et + 10 jours post-confluence. Pour chaque condition, il y avait deux puits pour l'extraction des protéines totales et deux puits pour l'extraction de l'ARN total.

### 9.2 Coloration des cellules au Trypan bleu et décompte des cellules

Les cellules ont été lavées avec 1 ml de trypsine (Gibco BRL, Burlington, Ontario), puis décollées avec 0,5 ml de trypsine à 37 °C dans une atmosphère à 95%

air et 5% CO<sub>2</sub>. Après centrifugation des cellules à 4°C pendant 5 minutes à 1000 rpm, elles ont été resuspendues dans un certain volume de milieu (dépendant du volume du culot de cellules). Du Trypan bleu 4% (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis) a été ajouté à la suspension cellulaire afin d'avoir une concentration finale de Trypan bleu de 0,4%. Après un temps d'incubation de 5 minutes, un volume de 10 µl de la suspension cellulaire/Trypan bleu a été déposé dans les deux chambres de l'hémacytomètre (Hausser Scientific, Horsham, États-Unis). Les cellules viables (les cellules blanches) ainsi que les cellules mortes (les cellules bleues) ont été comptées au microscope à l'aide d'un compteur à cellules manuel (VWR, Mississauga, Ontario).

#### **10. Fractionnement des cellules épithéliales le long de la crypte colonique de souris adultes**

La procédure est basée sur la technique de Weiser réadaptée de Pothier et al. (Ménard *et al.*, 1987). Le segment de côlon d'une souris adulte a d'abord été inversé sur un tube Tubing PE 240 (BD Biosciences, Mississauga, Ontario) et il a été ligaturé en segments de 4cm avec du fil à coudre. Les segments ont été lavés 2X avec 10 ml de tampon KRP pH 7.5 (5mM de KCl, 1,2mM de MgSO<sub>4</sub>, 1,2mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 118mM de NaCl et 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Pour la dissociation cellulaire, 10 ml de la solution EDTA pH 7.5 (2,5mM de EDTA, 0,25M de NaCl et 0,5mM de DTT) à 4°C a été ajouté dans un erlenmeyer de 50 ml contenant les segments coloniques et ils ont été agités pendant 5 minutes avec des intervalles de repos sur glace: agitation 1 minute, repos 1 minute, agitation 1 minute, repos 1 minute et agitation 1 minute. La suspension cellulaire a été récupérée dans un tube Falcon de 15 ml et gardée sur glace. L'agitation a été répétée jusqu'à ce que l'épithélium ne se détache plus. Les tubes ont été centrifugés à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C et les cellules ont été lavées avec

10 ml de tampon KRP puis de nouveau centrifugées. Les protéines totales ont été extraites comme décrit à la section 7.1.1. et dosées selon la méthode de Bradford.

## **11. Extraction de l'ARN total**

L'extraction de l'ARN a été effectuée selon le protocole *Totally RNA extract* (Ambion, Austin, États-Unis). Toutes les manipulations ont été réalisées à 4°C en prenant soin d'utiliser des instruments stériles. Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et 500 µl de la solution dénaturante a été ajoutée. Elles ont été récupérées à l'aide d'un grattoir, transférées dans un tube eppendorf de 1,5 ml et très bien resuspendues par pipettage répété. Un volume de phénol/chloroforme a été ajouté, la solution a été homogénéisée en vortexant doucement et incubée pendant 5 minutes sur glace. Après avoir centrifugé 5 minutes à 12000 x g, la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube eppendorf. Il y a eu ajout de 1/10 d'acétate de sodium (NaAc), mélange de la solution par inversion pendant 10 secondes et ajout d'un volume de phénol/chloroforme acide. La solution a été vortexée vigoureusement, mise sur glace pendant 5 minutes et de nouveau centrifugée à 12000 x g pendant 5 minutes. Suite au transfert de la phase aqueuse dans un nouveau tube eppendorf, un volume d'isopropanol a été ajouté et bien mélangé. L'ADN a été précipité en plaçant le tube à -20°C pendant 30 minutes suivi d'une centrifugation à 12000 x g pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans 100 µl d'eau DEPC et 1/2 volume (50 µl) de chlorure de lithium (LiCl) a été ajouté et mélangé. La solution a été incubée à -20°C pendant 30 minutes et centrifugée à 12000 x g pendant 15 minutes. Le culot d'ARN a été lavé avec 300 µl d'éthanol 70% froid, agité pendant 2 minutes et centrifugé pendant 5 minutes à 12000 x g. L'éthanol a été enlevé et le culot d'ARN a été re-centrifugé pendant 3 minutes. L'ARN a été séché, 40 µl d'eau DEPC a été ajoutée et incubé

pendant 10 minutes. L'ARN a été par la suite chauffé pendant 3 minutes à 70°C et il a été resuspendu par pipettage répété. Afin d'éliminer toutes traces d'ADN, l'ARN a été traité à la DNase comme suit : 4,4 µl de tampon DNase 10X (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada) a été ajouté et 1 U/tube d'une dilution 1/10 de l'enzyme DNase (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada). La réaction a été incubée à 37°C pendant 30 minutes. Enfin, 5mM de EDTA a été ajouté et l'enzyme a été inactivée à 75°C pendant 10 minutes. L'ARN a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Biorad, Mississauga, Ontario).

#### 11.1 Réaction de polymérisation en chaîne avec la transcriptase inverse (RT-PCR)

1 µg d'ARN a été utilisé auquel de l'eau DEPC a été ajoutée pour un volume total de 10 µl. Les structures secondaires ont été déstabilisées en chauffant l'ARN total à 75°C pendant 5 minutes. La re-formation des structures secondaires a été empêchée en déposant immédiatement la réaction sur glace pendant 5 minutes. Une solution de 10 µl contenant les composants suivants a été préparée : 0,3 µl d'eau DEPC (Ambion, Austin, États-Unis), 4 µl du tampon AMV RT 5X (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada), 0,8 µl d'un mélange de dNTPs (25 mM) (Amersham Biosciences, Québec, Canada), 2,4 µl d'oligos dT (Amersham Biosciences, Québec, Canada), 1 µl d'inhibiteur de RNase (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada) et 1,5 µl de la transcriptase inverse (Roche Diagnostics Gmbtl, Québec, Canada). Ce 10 µl a été ajouté au 10 µl contenant l'ARN et l'eau DEPC, puis la réaction de RT a été effectuée pendant une heure à 42°C. Enfin, la transcriptase inverse fut inactivée durant 5 minutes à 95°C.



## 11.2 PCR quantitatif en temps réel

L'analyse des ADN<sub>c</sub> a été effectuée en PCR quantitatif en temps réel utilisant le LightCycler de Roche version 1.01 (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). Pour chaque expérience, les amorces servant à amplifier le gène d'intérêt (Tableau 4) et le gène de référence ont d'abord été vérifiées afin de s'assurer de l'absence de dimères d'amorces. Les courbes de standardisation du gène d'intérêt et du gène de référence ont par la suite été faites en utilisant un échantillon calibrateur, soit du côlon humain fœtal 19 semaines pour CDP et du côlon d'une souris M7 745x770 pour PLZF (Tableau 5). La courbe ainsi obtenue devait avoir une efficacité entre 1,95 et 2,05 et une erreur inférieure à 0,05. Des dilutions sériées (1 :1; 1 :10; 1 :20; 1 :50; 1 :100, 1 :500 et un contrôle négatif) ont été préparées en utilisant le calibrateur choisi (Tableau 5) et en prenant soin de bien vortexer entre chaque dilution et de centrifuger par la suite. Les dilutions sériées utilisées pour vérifier les amorces étaient : 1 :1; 1 :10; 1 :100 et un contrôle négatif. Les dilutions sériées (1 :1; 1 :10; 1 :20; 1 :50; 1 :100; 1 :500 et un contrôle négatif) ont été faites en triplicata pour établir les courbes de standardisation du calibrateur. Le mélange réactionnel de l'amplification était composé de 10 µl du mélange SYBRGreen (QIAGEN, Mississauga, Ontario), de 500nM de chacun des oligonucléotides et de 6 µl d'eau *nuclease free* pour un volume total de 18 µl. Le mélange réactionnel a été mis dans un tube capillaire (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Laval) et 2 µl d'ADN<sub>c</sub> a été ajouté. Pour le contrôle négatif, il y a eu ajout de 2 µl d'eau *nuclease free*. Les capillaires ont été centrifugés pendant 5 secondes à 2000 rpm et insérés dans l'appareil. L'amplification a été effectuée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes; 50 cycles des étapes successives 94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. Une courbe de dissociation permettant de prendre les

données de façon continue fut par la suite effectuée : 95°C non maintenu, 65°C pendant 30 secondes et passage à une température de 95°C à un rythme de 0.2°C par seconde. La réaction a finalement été refroidie à 4°C pendant 30 secondes. Lors de la quantification des niveaux d'expression de l'ARN<sub>m</sub>, une dilution de l'échantillon calibrateur se trouvant sur la droite de la courbe standard a été ajoutée afin de réajuster la différence d'efficacité pour chacun des échantillons étudiés. Le ratio normalisé représenté par les niveaux d'expression du gène d'intérêt sur ceux du gène de référence a été calculé à l'aide du logiciel version LCS4 4.0.0.23.

**Tableau 4. Séquences des amorces utilisées en PCR quantitatif en temps réel pour vérifier l'expression du messenger de CDP et de PLZF**

Séquences des amorces CDP humaines
RTIME CDP Down: 5'-CTCACCCAAGGCTCTGTCTC-3'
RTIME CDP Up: 5'-GGCTGTCACTGACTGAGCTG-3'
Séquences des amorces PLZF de souris
mPLZF7: 5'-CCCAAGGCCCTCATGGATATC-3'
mPLZF8: 5'-GGGCAGAACTACCCAGCAAC-3'

**Tableau 5. Calibrateur et gène de référence employés pour l'amplification du messenger de CDP et PLZF en PCR quantitatif en temps réel**

	Calibrateur	Gène de référence
CDP	côlon fœtal humain 19 sem.	TBP
PLZF	745x770 M7 côlon	TBP

### III-Résultats

#### 1. Caractérisation de l'interaction du facteur CDP avec le gène PLZF

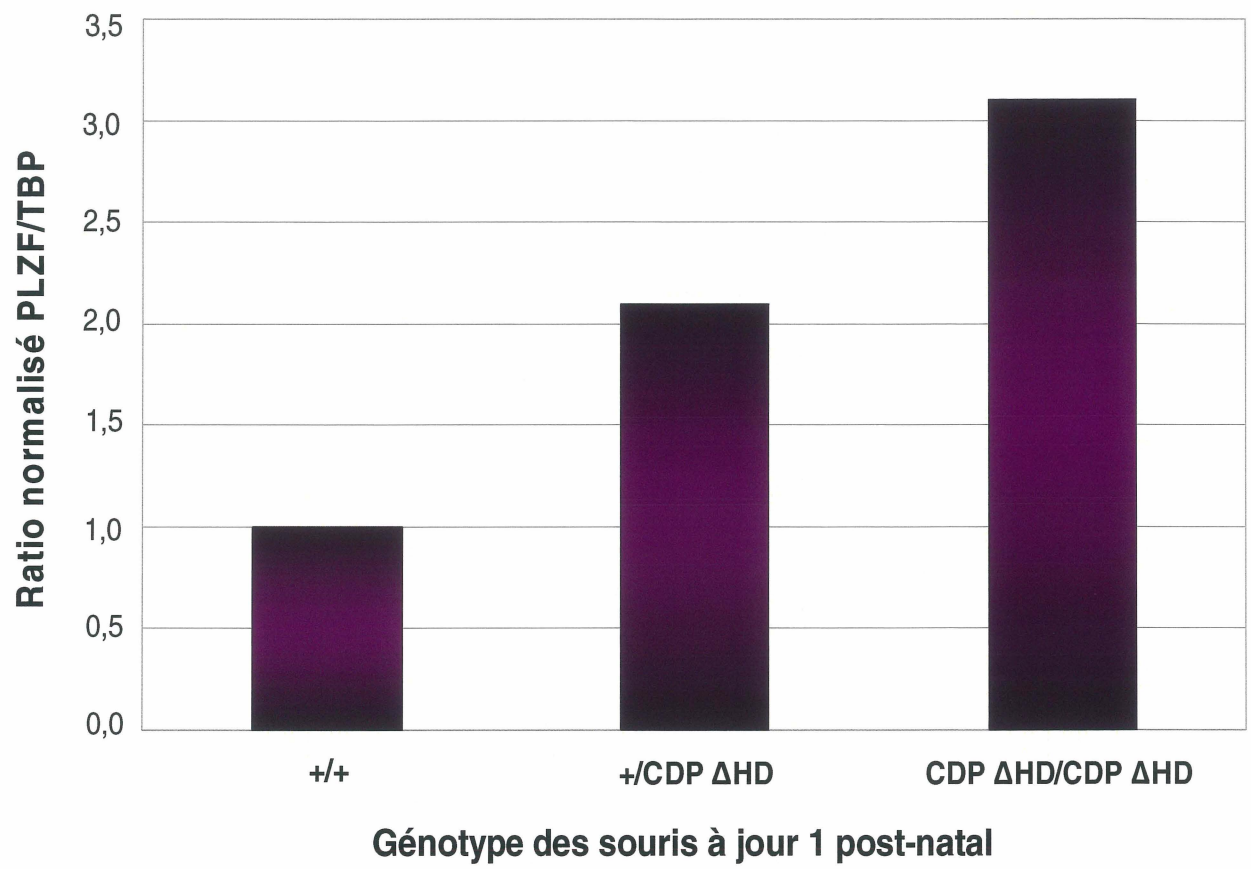
##### 1.1 La région 5'-UTR du gène PLZF est une cible du facteur CDP.

Tout d'abord, le modèle de souris CDP mutant a été utilisé dans le but d'identifier des gènes cibles de CDP dans le côlon. Ce modèle est caractérisé par une inactivation du gène par la présence d'une cassette néomycine dans le domaine HD menant à un hypomorphisme, c'est-à-dire à la production d'une protéine CDP altérée (Sinclair *et al.*, 2001; Boudreau *et al.*, 2002). Une étude différentielle par criblage de micropuces à ADN utilisant ce modèle murin mutant en CDP a permis d'identifier PLZF comme gène cible potentiel de CDP dans le côlon. En effet, cette analyse a permis de prédire une augmentation de l'expression de ce gène de 10 fois dans le côlon des souris CDP mutantes par rapport aux souris normales à jour 1 post-natal (Boudreau *et al.*, résultats non publiés). Afin de valider les résultats obtenus avec les micropuces, une analyse par PCR quantitatif en temps réel a été effectuée en utilisant de l'ADNc provenant de côlon de souris homozygotes et hétérozygotes mutantes pour le gène CDP ainsi que de souris de type sauvage. L'analyse du graphique montre qu'effectivement, l'expression du messager de PLZF est plus élevée dans le côlon des souris homozygotes mutantes pour CDP que dans celui des souris hétérozygotes et de type sauvage (Figure 5).

Puisque le gène PLZF semble être une cible colonique de CDP, nous avons par la suite vérifié l'existence de sites potentiels d'interaction du facteur CDP avec le gène

**Figure 5. Niveaux d'expression colonique du messenger de PLZF chez la souris.**

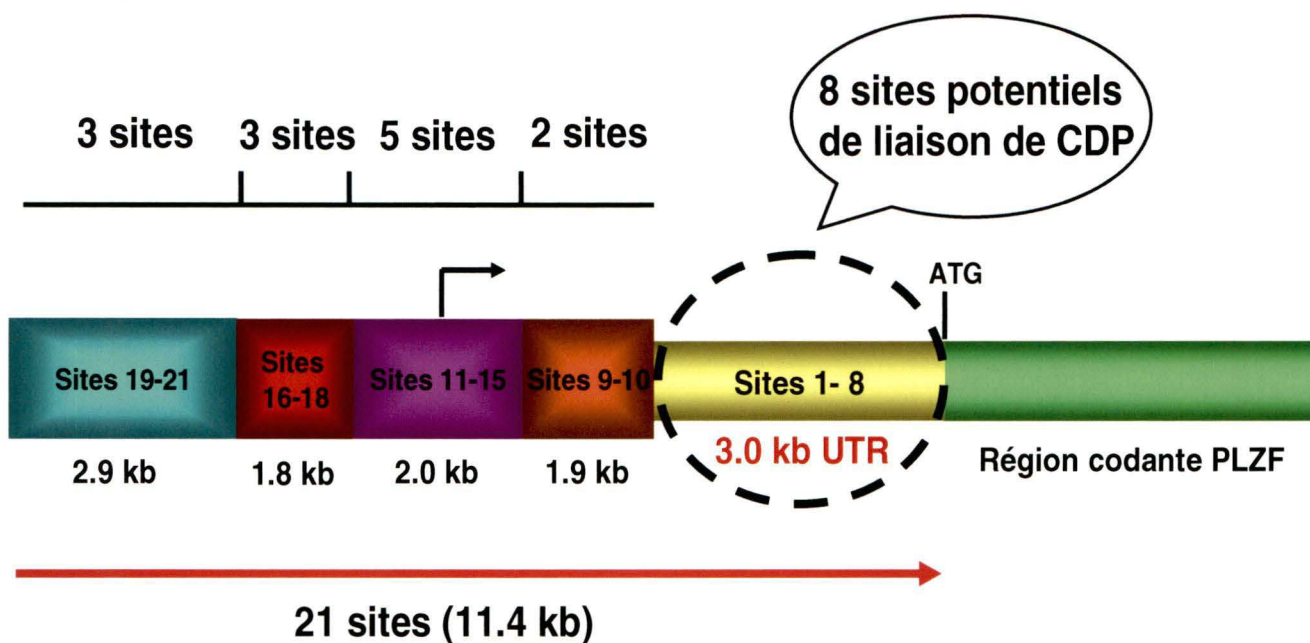
PCR quantitatif en temps réel utilisant des extraits totaux d'ARN de côlon de souris de type sauvage, hétérozygotes et homozygotes mutantes pour CDP au jour 1 post-natal. L'ARNm a été isolé et converti en ADNc. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à celles d'une courbe de standardisation du gène de référence TBP.



PLZF. Une analyse informatique du gène PLZF par l'utilisation de la matrice MatInspector ([http://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_matinspector/release\\_notes.html](http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/release_notes.html)) a prédit 21 sites potentiels de liaison pour le facteur CDP (Figure 6). Une tentative d'amplification de la région non codante du gène PLZF (11.4 kb) a d'abord été effectuée par PCR, mais en vain. C'est donc pour cette raison que cette région fut séparée en plusieurs régions d'environ 2 à 3 kb contenant un nombre variable de sites de liaison et que ces régions furent amplifiées de façon séquentielle. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'étude de la région de 3 kb 5'-UTR située en amont du site d'initiation de la traduction. Cette région contient le plus de sites potentiels de liaison pour CDP, soit 8 sites. Afin de déterminer l'effet fonctionnel de CDP sur cette région, un vecteur permettant l'expression de la protéine murine de CDP, soit le vecteur d'expression CMV-Cux et un vecteur permettant l'expression de la version humaine, soit le vecteur pEGFP-CDP, ont été co-transfectés transitoirement dans la lignée 293T avec la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF couplée au gène rapporteur de la luciférase. Des essais luciférase ont permis de démontrer que Cux et CDP diminuent d'environ deux fois l'activité transcriptionnelle de la région de 3 kb du gène PLZF en comparaison avec le contrôle dans lequel Cux et CDP sont absents (Figure 7A). Une analyse Western a confirmé que les protéines Cux et CDP étaient bien produites dans les essais de co-transfection (Figure 7B). Ensuite, afin de déterminer s'il était possible d'obtenir un effet semblable dans une lignée d'adénocarcinome de côlon humain, les cellules T84 ont été co-transfectées de façon transitoire avec le vecteur d'expression pEGFP-CDP et le vecteur luciférase pGL3 basic qui est sous le contrôle de la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Les essais luciférase montrent que la protéine CDP humaine diminue de façon significative, soit plus de trois fois,

**Figure 6. Interaction potentielle de CDP avec le gène PLZF. (A)** Représentation schématique du gène PLZF avec ses 21 sites potentiels d'interaction pour le facteur CDP tel que prédit par utilisation de la matrice MatInspector. Le gène a été séparé en cinq régions d'une longueur de 2 à 3 kb afin d'en faciliter l'étude. La portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF située en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) est celle qui contient le plus de sites potentiels de liaison pour CDP, soit 8 sites. **(B)** Liste de la séquence des sites potentiels liés par CDP sur le gène PLZF selon la matrice MatInspector.

**A**



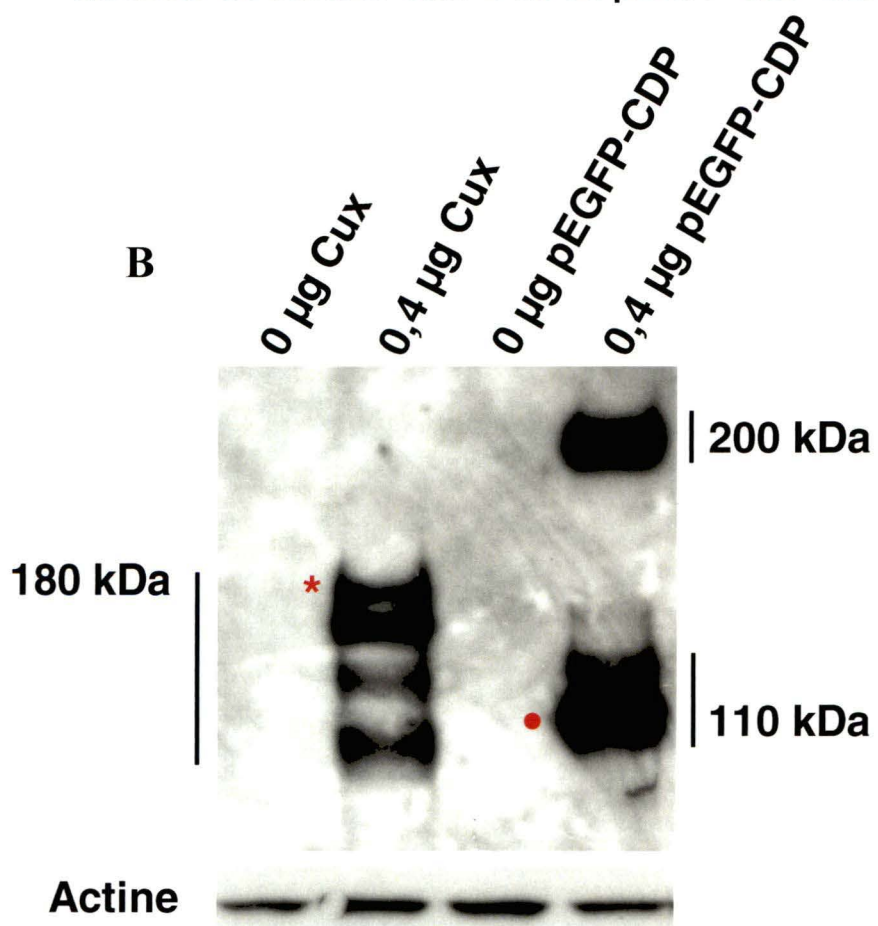
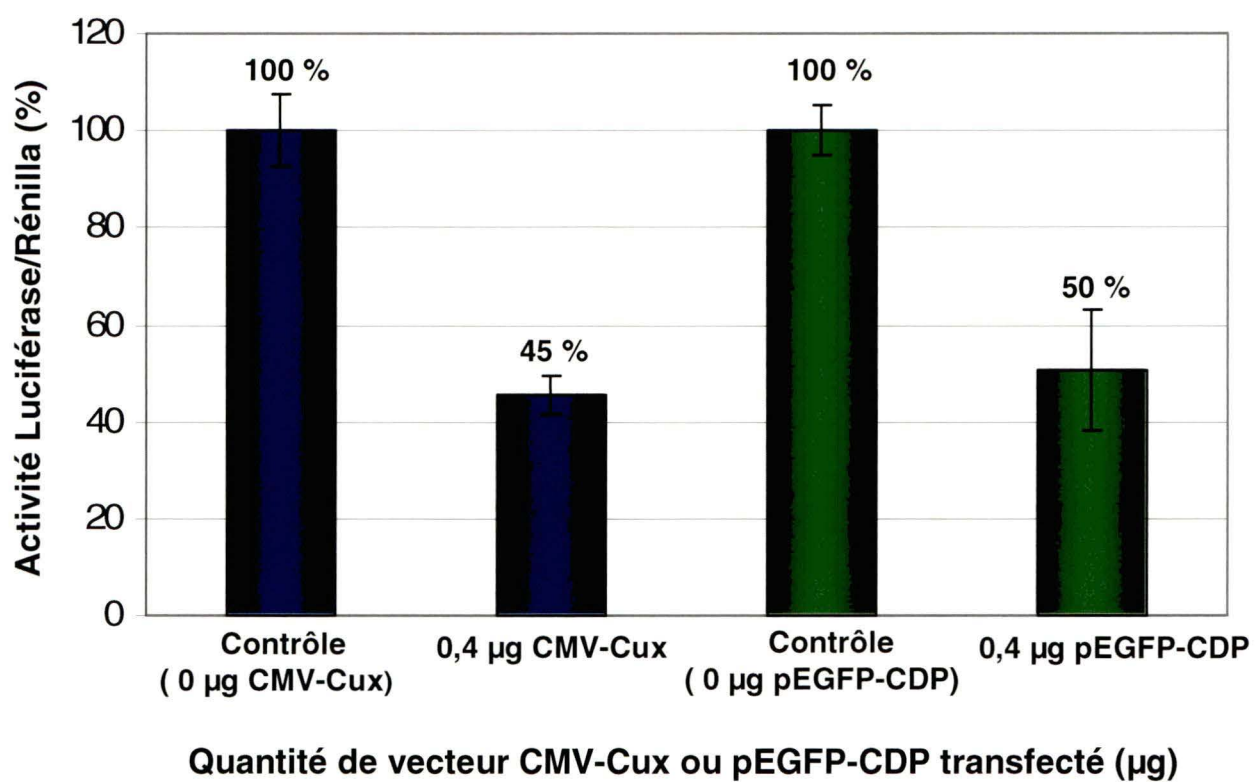
**B**

Sites	Position sur le gène (pb)	Séquences
1	9529-9545	5'-ACAGCCAAAAGAATG-3'
2	9807-9823	5'-CCAATATTGCAGTGAA-3'
3	9814-9830	5'-ACAGCGACCAATATTC-3'
4	9908-9924	5'-CCTCTTATTGATCCCGG-3'
5	10005-10021	5'-GCTGGAAGTGATATTC-3'
6	10148-10164	5'-CCATAGTTAAATATGG-3'
7	10657-10673	5'-AGCCTCAAAGTTATTG-3'
8	10846-10862	5'-CCACAGAAATCTATG-3'
9	7126-7142	5'-CCGCGGGGATCTATTG-3'
10	7123-7139	5'-TCGACAATAGATCCCC-3'
11	5778-5794	5'-GCACAATCCTCTATGG-3'
12	5525-5541	5'-CCAATAAACCTTATCA-3'
13	5177-5193	5'-CAGCTCATCTATTCCTC-3'
14	5078-5094	5'-CCACTAACTGAGCTCT-3'
15	4848-4864	5'-TGTTTAATAGATCTACA-3'
16	4755-4771	5'-TCCTTCATCTATTTAC-3'
17	3581-3597	5'-TCACTAATCAAAGAAG-3'
18	3183-3199	5'-GCAACGAATGTTATGC-3'
19	2945-2961	5'-CCGCTGTCAGCTATCG-3'
20	2925-2941	5'-ACAATATTCAAATATCA-3'
21	2687-2703	5'-CCCATAATAGGACTCA-3'

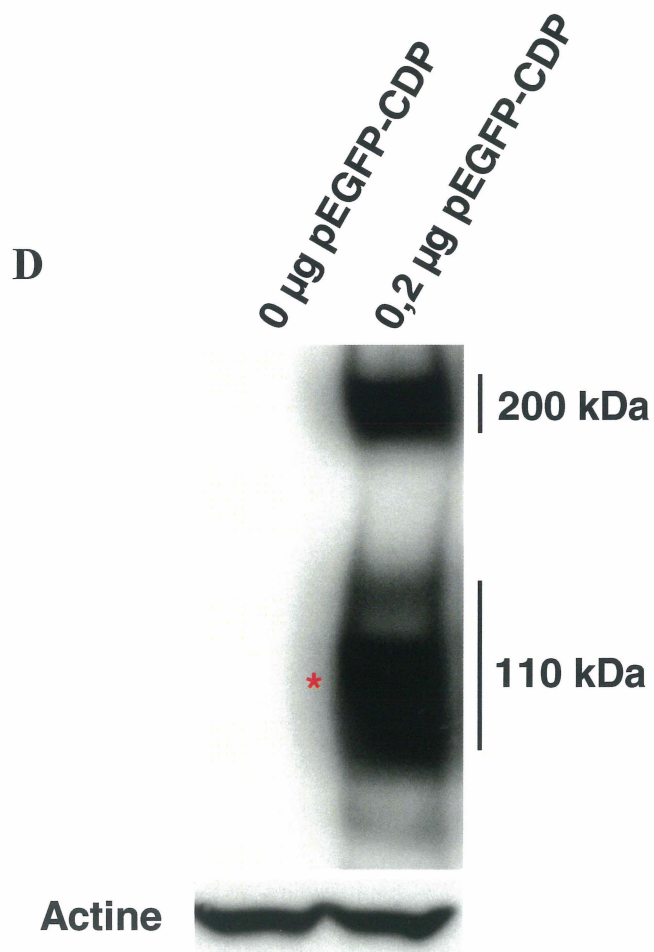
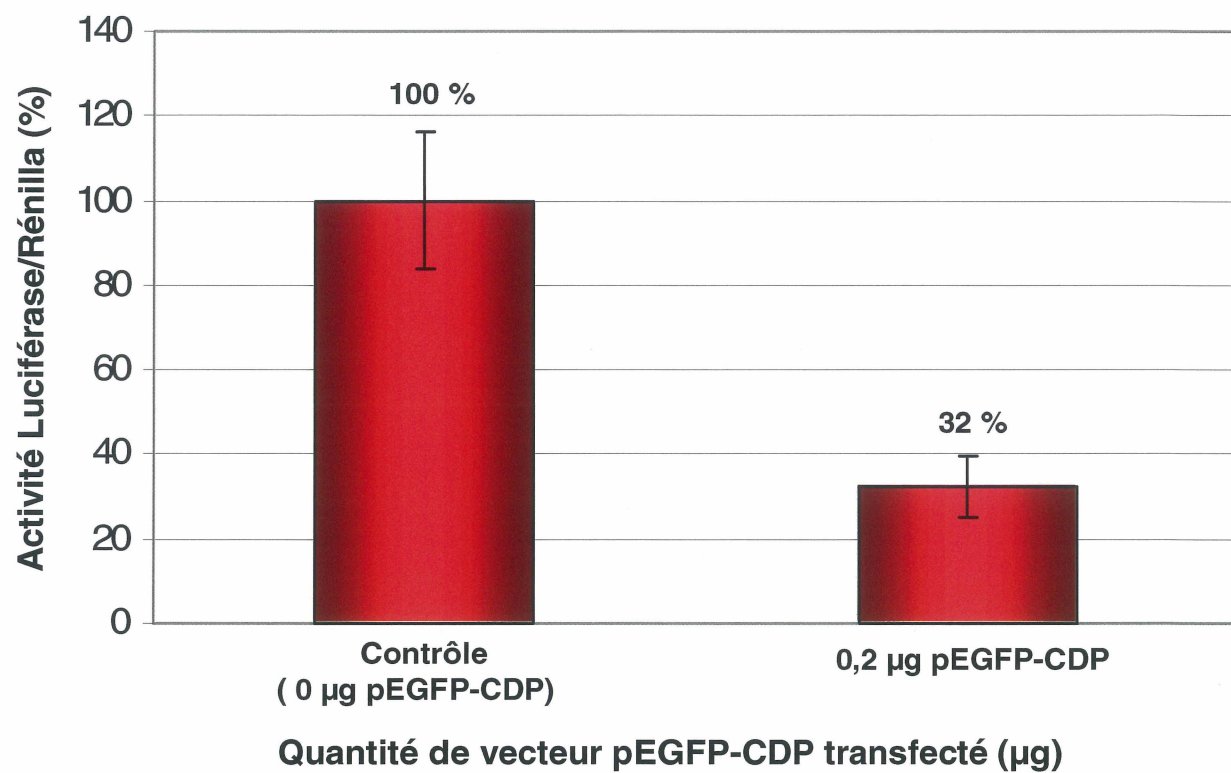


**Figure 7. Effet fonctionnel de CDP sur le gène PLZF dans les cellules 293T et dans la lignée d'adénocarcinome de côlon humain T84.** (A) Les cellules 293T ont été co-transfectées de façon transitoire avec 0 et 0,4 µg du vecteur d'expression CMV-Cux ou pEGFP-CDP et avec le vecteur luciférase pGL3 basic ayant sous son contrôle la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Les cellules ont été récoltées 48 heures après la transfection et analysées pour leur activité luciférase. Les données ont été normalisées avec les valeurs de la Rénilla et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de trois expériences différentes. (B) Analyse Western utilisant un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP. La bande avec un astérix (\*) correspond à un poids moléculaire de 180 kDa lorsque comparée à un marqueur coloré et représente la forme murine de CDP tronquée en N-terminal. L'anticorps détecte d'autres formes de Cux non caractérisées à ce jour et situées en dessous de celle à 180 kDa. La bande à 200 kDa représente la forme complète de CDP alors que la bande avec un point (•) correspondant à un poids de 110 kDa est le résultat du clivage protéolytique de CDP dans la phase S (Moon *et al.*, 2001). (C) Des quantités de 0 et 0,2 µg du vecteur d'expression pEGFP-CDP ainsi que le vecteur luciférase pGL3 basic ayant sous son contrôle la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF ont été co-transfectés transitoirement dans les cellules de la lignée d'adénocarcinome de côlon humain T84. Les cellules ont été récoltées 48 heures après la transfection et analysées pour leur activité luciférase. Les données ont été normalisées avec les valeurs de la Rénilla et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de trois expériences différentes. (D) Analyse Western utilisant un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP. La bande à 200 kDa représente la forme complète de CDP alors que la bande avec un astérix (\*) correspondant à un poids de 110 kDa est le résultat du clivage protéolytique de CDP dans la phase S (Moon *et al.*, 2001).

## A Lignée 293T



### C Lignée T84



l'activité transcriptionnelle de la portion de 3 kb du gène PLZF et ce, dans la lignée cancéreuse de côlon humain T84 (Figure 7C). Une analyse Western a confirmé que la protéine CDP était bien produite dans les essais de co-transfection (Figure 7D).

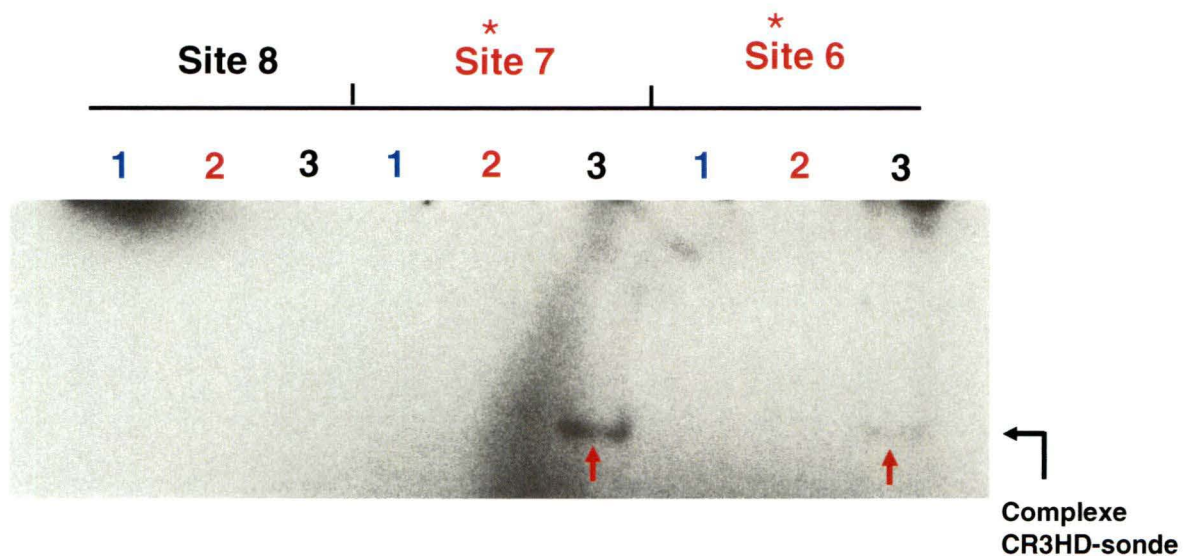
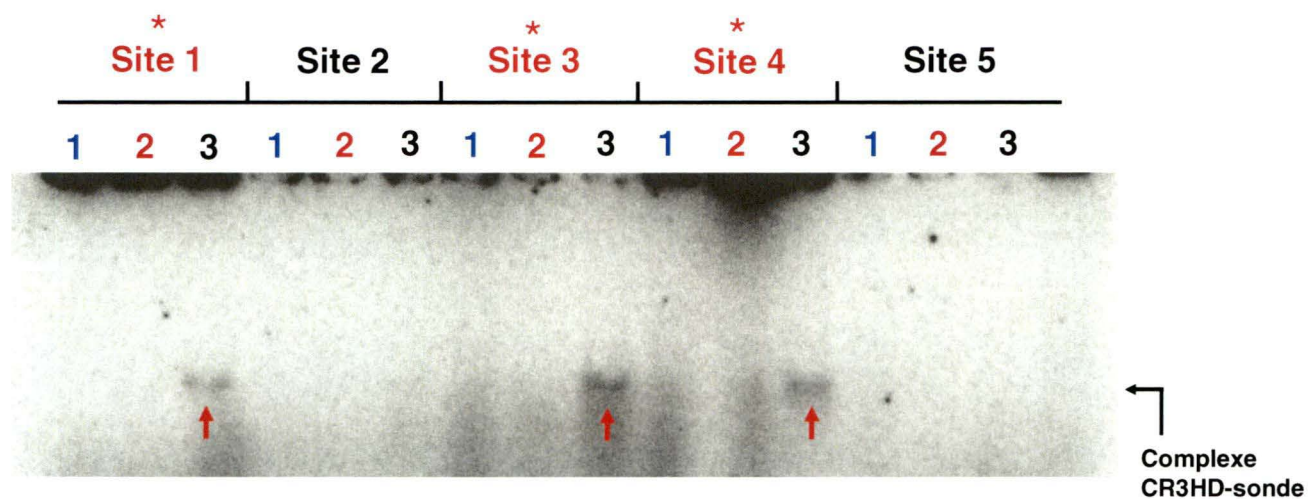
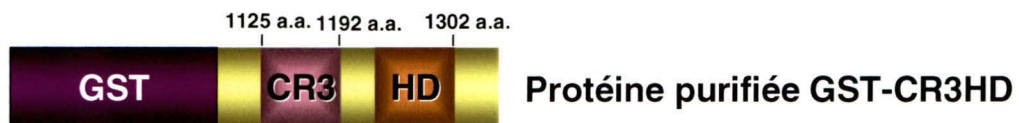
### 1.2 Capacité de liaison de CDP sur la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF.

Le potentiel d'interaction de CDP sur la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF a par la suite été déterminé par gel de rétention utilisant des protéines purifiées GST fusionnées aux domaines de liaison CR3 et HD de CDP et 8 sondes marquées au  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP représentant les 8 sites potentiels de liaison pour CDP dans la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Comme contrôle négatif d'interaction, la protéine GST seule fut utilisée en parallèle dans les essais. Les résultats montrent la présence de cinq bandes correspondant aux complexes retardés formés entre la protéine de fusion GST-CR3HD et l'ADN et indiquant que la protéine CDP a la capacité de se lier sur les sites 1, 3, 4, 6 et 7 dans la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF *in vitro* (Figure 8).

### 1.3 Corrélation entre les niveaux d'expression de CDP et de PLZF dans différentes lignées cancéreuses colorectales humaines.

Des évidences dans la littérature ont démontré une expression altérée de CDP dans les cancers du sein (Goulet *et al.*, 2002) et de l'utérus (Zeng *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2002). De plus, PLZF se retrouve fusionnée à RAR $\alpha$  dans la leucémie promyélocytique sévère (APL) (Chen *et al.*, 1993). Comme CDP est exprimée dans l'épithélium de l'iléon et du côlon proximal chez la souris (Boudreau *et al.*, 2002) et

**Figure 8. Sites d'interaction potentiels de CDP avec la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF.** Gel de rétention utilisant des protéines purifiées GST seules et GST fusionnées aux domaines de liaison CR3 et HD de CDP. Les sondes sont des oligonucléotides double brins marqués radioactivement au  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP et représentent les 8 sites potentiels de liaison pour le facteur CDP dans la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Les conditions de réaction de liaison à l'ADN sont (1) la sonde libre seule; (2) la sonde incubée avec la protéine GST et (3) la sonde incubée avec la protéine de fusion GST-CR3HD. Les différents complexes retardés formés ont été séparés sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant et le film a été exposé toute la nuit. Les flèches indiquent la présence des bandes correspondant à la formation des différents complexes retardés et les astérisx ( \* ) identifient les sites montrant une interaction positive avec GST-CR3HD.

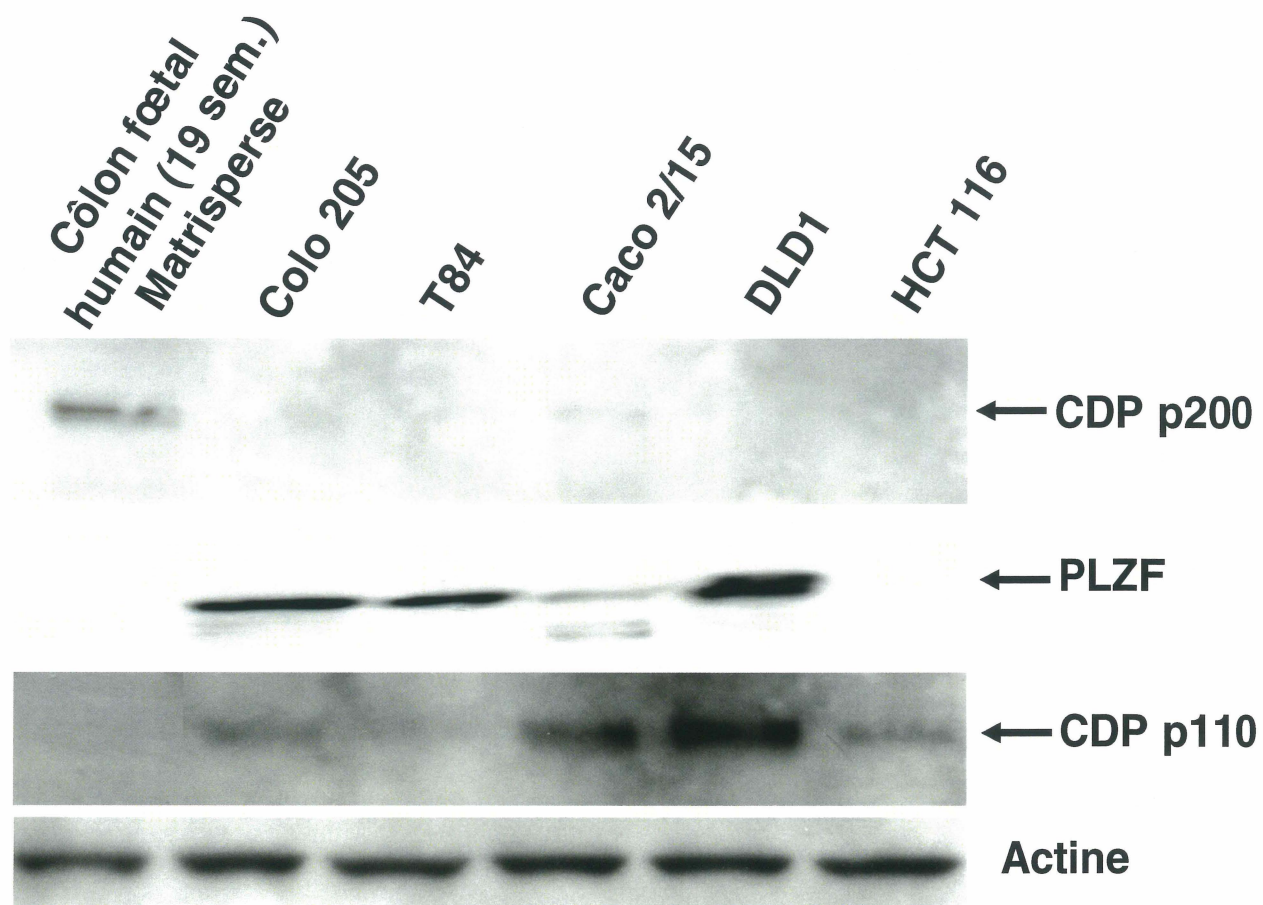


1 : sonde libre  
 2 : GST  
 3 : GST-CR3HD

que PLZF semble être une cible de CDP dans le côlon, nous avons émis l'hypothèse que ces deux protéines pourraient être impliquées dans le cancer colorectal. Le profil d'expression de CDP et de PLZF a donc été déterminé dans cinq lignées d'adénocarcinomes de côlon humain : HCT 116, DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 et comparé à des cellules épithéliales coloniques isolées du tissu normal, soit du côlon humain d'un fœtus âgé de 19 semaines. L'analyse Western montre que la protéine complète CDP, CDP p200, est non détectable dans la majorité des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain, sauf dans la lignée Caco 2/15 où elle est faiblement exprimée. Cette isoforme est néanmoins détectable dans les colonocytes fœtaux humains normaux (Figure 9). La protéine PLZF est fortement exprimée dans toutes les lignées d'adénocarcinomes de côlon humain, mais elle n'est pas détectable dans le tissu sain de côlon fœtal humain. Ces résultats montrent qu'il y a un patron d'expression réciproque entre les cellules qui expriment CDP et celles qui expriment PLZF. En effet, la faible expression de CDP p200 observée exclusivement dans les cellules Caco 2/15 est corrélée avec la plus faible expression relative de la protéine PLZF observée dans ces mêmes cellules. Ensuite, nous avons vérifié s'il était possible de détecter la présence d'une autre forme de la protéine CDP dans les différentes lignées cancéreuses de côlon humain. L'analyse de l'immunobuvardage de type Western montre que l'isoforme issue du clivage protéolytique de CDP, soit CDP p110, est exprimée dans les lignées cancéreuses colorectales humaines, mais qu'elle n'est pas détectée dans les colonocytes fœtaux humains normaux.

**Figure 9. Profil d'expression protéique de CDP et de PLZF dans des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain.** Analyse Western utilisant des extraits de protéines totales de cinq lignées cancéreuses colorectales humaines HCT 116, DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 et de cellules épithéliales coloniques isolées d'un fœtus humain de 19 semaines. Des anticorps polyclonaux contre CDP et PLZF ont été utilisés pour la détection des deux isoformes (CDP p200 et CDP p110) de CDP et PLZF, respectivement.

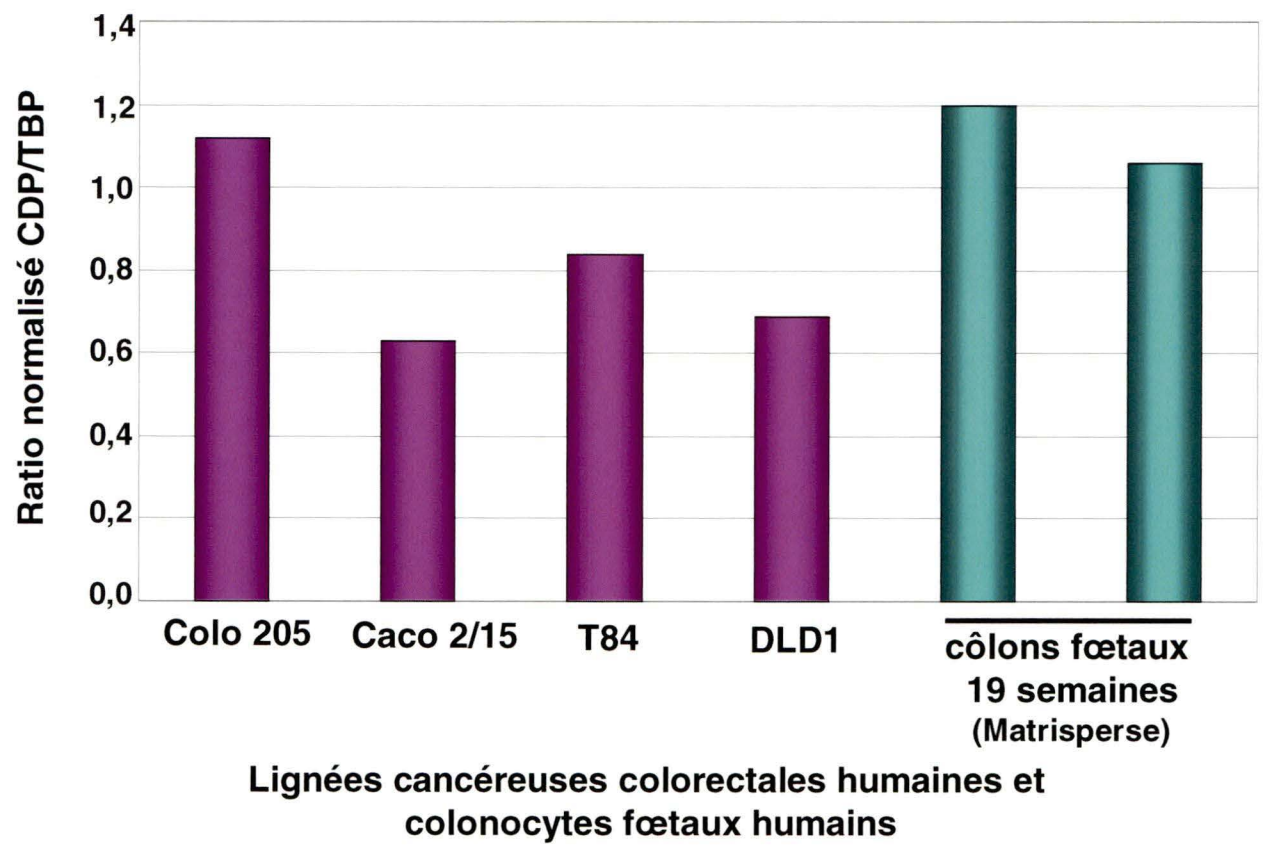




#### 1.4 Profil d'expression du messenger de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines et dans les colonocytes fœtaux humains.

Puisque la protéine complète CDP p200 n'est pas détectée dans la plupart des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain, mais qu'il y a tout de même expression de la forme clivée à 110 kDa, nous avons vérifié la possibilité que les niveaux d'expression de l'ARNm de CDP soient modulés dans ces lignées. En effet, dans les cancers, plusieurs événements épigénétiques peuvent mener à une absence d'expression du gène et, par conséquent, de la protéine (Jones et Baylin, 2002). Afin de vérifier cette hypothèse, des extraits totaux d'ARN provenant de quatre lignées cancéreuses de côlon humain DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 et de cellules épithéliales coloniques isolées de deux côlons de fœtus âgés de 19 semaines ont été analysés par PCR quantitatif en temps réel. Les résultats montrent que les niveaux d'expression du messenger de CDP dans les lignées cancéreuses sont comparables à ceux des colonocytes fœtaux humains normaux de 19 semaines (Figure 10). Par exemple, la lignée Colo 205 est celle qui exprime le plus de messenger de CDP, alors que la protéine n'est pas détectée dans cette lignée (Figure 9 vs Figure 10). Ceci indique que l'absence d'expression de la protéine CDP p200 dans la majorité des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain ne résulte pas d'un événement épigénétique au niveau du gène. Cette observation pose l'hypothèse que la stabilité de la protéine CDP soit plutôt affectée.

**Figure 10. Profil d'expression du messager de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines et dans les colonocytes fœtaux humains.** PCR quantitatif en temps réel utilisant des extraits totaux d'ARN de cellules d'adénocarcinomes de côlon humain DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 et de cellules épithéliales isolées de côlons de fœtus âgés de 19 semaines. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à celles d'une courbe de standardisation du gène de référence TBP (*TATA binding protein*).



## **2. Étude du rôle potentiel de CDP dans la prolifération épithéliale colonique et dans la progression du cancer colorectal.**

### **2.1 Détermination de l'isoforme de CDP exprimée le long de l'axe vertical de la crypte colonique chez la souris adulte.**

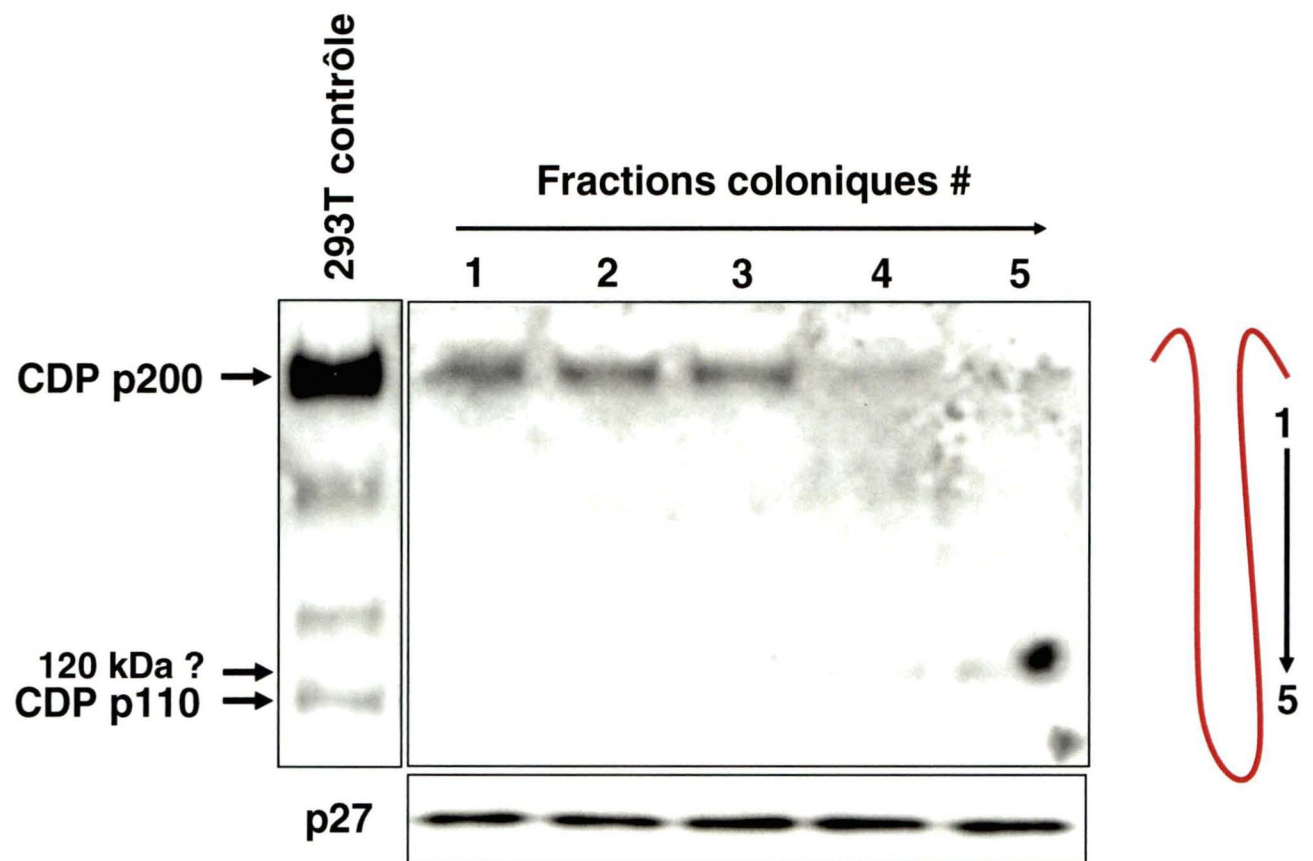
Les travaux antérieurs du Dr Boudreau ont permis de mettre en évidence un gradient d'expression de CDP le long de l'axe vertical de la crypte colonique chez la souris adulte (Boudreau *et al.*, 2002). En effet, la protéine CDP est très faiblement exprimée dans le fond des cryptes alors que son expression augmente dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules épithéliales coloniques le long de l'axe vertical de la crypte avec une très forte expression près de la surface épithéliale. Puisqu'il y a une modulation des isoformes de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines, nous avons vérifié s'il y avait une expression différentielle de ces isoformes le long de l'axe vertical de la crypte du côlon. Les cellules épithéliales cryptales du côlon de souris adultes ont donc été isolées par la technique de Weiser (voir matériel et méthodes). Brièvement, cette technique consiste à inverser un segment de côlon sur un tube afin d'en exposer l'épithélium et de le ligaturer avec du fil à coudre pour former des segments d'environ 4cm. Le fractionnement cellulaire se fait par ajout d'une solution EDTA et par agitation des segments permettant ainsi un détachement progressif des cellules le long de la crypte colonique. Cette technique a permis la récolte de cinq fractions coloniques, les fractions #1 à 5 (Figure 11). Les premières fractions correspondent aux cellules qui se détachent plus facilement, donc localisées dans le haut de la crypte alors que les dernières fractions représentent les cellules qui se détachent plus difficilement et se retrouvent, par conséquent, situées dans le fond de

la crypte. Les résultats de l'analyse Western montrent que la protéine complète CDP p200 est exprimée plus fortement dans les fractions coloniques #1, 2 et 3, lesquelles correspondent aux cellules situées dans le haut de la crypte et que son expression diminue plus on avance dans le fond de la crypte représenté par les fractions cellulaires # 4 et 5. Il est à noter que la bande qui apparaît à environ 120 kDa ne correspond pas à la forme tronquée de CDP de 110 kDa, mais qu'il s'agirait peut-être d'une autre isoforme de CDP non caractérisée à ce jour. L'expression constante de la protéine p27 dans toutes les fractions coloniques montre que la technique n'a pas permis de récolter les fractions cellulaires du fond de la crypte, mais elle confirme que la diminution de l'expression de CDP p200 observée dans les dernières fractions n'est pas causée par une dégradation des protéines. Donc, la forme complète de CDP p200 semble l'isoforme majeure modulée le long de l'axe vertical de la crypte colonique.

## 2.2 Expression ectopique de CDP dans les lignées stables de cellules cancéreuses colorectales humaines.

Il a été démontré précédemment que la majorité des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain expriment la forme de 110 kDa de CDP, mais que la protéine complète n'est que faiblement détectable (Figure 9). Afin d'explorer la fonction de CDP au niveau des cellules épithéliales du côlon, nous avons tenté de réintroduire l'expression de la grande forme de CDP dans les lignées d'adénocarcinomes de côlon humain par infection rétrovirale. En association avec le profil d'expression de CDP le long de la crypte colonique (Figure 11), notre hypothèse de départ était que l'isoforme de CDP

**Figure 11. Expression différentielle de CDP dans la crypte colonique chez la souris adulte.** Les cellules épithéliales coloniques de souris adultes ont été isolées par la technique de Weiser. Cinq fractions cellulaires ont été obtenues desquelles les protéines totales ont été extraites. 36 µg de protéines totales ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Le contrôle positif utilise les cellules 293T lesquelles expriment de façon endogène les isoformes de 200 kDa et de 110 kDa de CDP. Un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP a été utilisé pour la détection de CDP p200 et CDP p110. Les niveaux d'expression de la protéine p27 ont été déterminés afin de s'assurer de l'intégrité des extraits protéiques et d'une quantité constante de protéines dans chacun des puits.



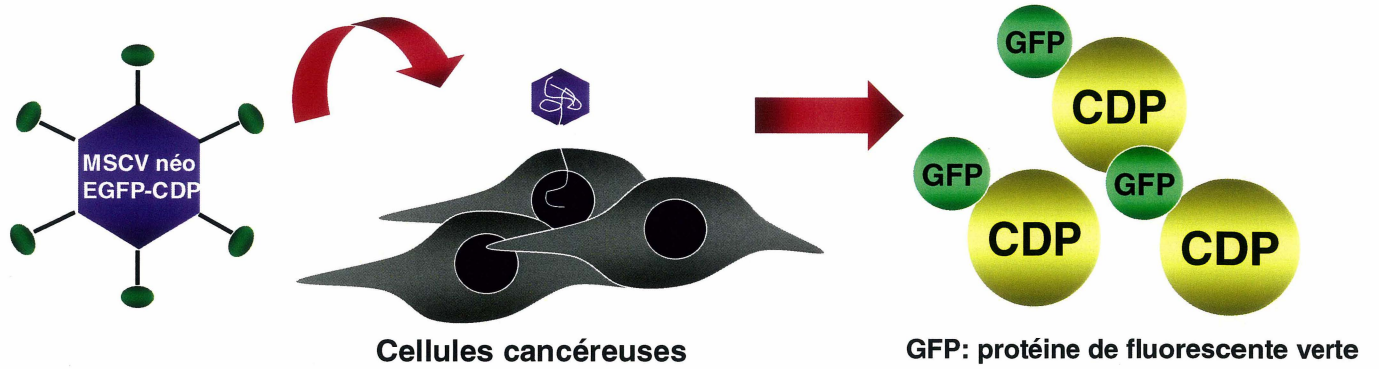


de 200 kDa pouvait ralentir la prolifération cellulaire. Pour ce faire, il y a d'abord eu production des rétrovirus. Un vecteur contenant les gènes nécessaires à la formation de la capside virale a été co-transfecté de façon transitoire dans les 293T avec le vecteur d'expression MSCV néo EGFP-CDP permettant la production de la protéine CDP ou le vecteur MSCV néo vide comme contrôle négatif. Suite à la récolte des rétrovirus, les cellules des lignées cancéreuses colorectales humaines HCT 116, DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 ont été infectées avec les différents rétrovirus permettant ainsi l'établissement de lignées stables qui surexpriment la protéine CDP fusionnée à la protéine de fluorescence verte GFP (Figure 12A). Afin de caractériser ces lignées, nous avons confirmé la production de la protéine CDP dans les différentes lignées établies par immunobuvardage de type Western (Figure 12B et C). Nous observons que parmi toutes les lignées générées, les cellules de la lignée d'adénocarcinome de côlon humain Caco 2/15 sont celles qui expriment le plus fortement la forme complète de CDP fusionnée à la protéine de fluorescence verte GFP (EGFP-CDP p200). Il est également intéressant de remarquer une augmentation de l'expression de CDP p110 dans les lignées qui surexpriment CDP. De plus, les résultats montrent une expression différentielle des isoformes de CDP en fonction de la lignée. En effet, les lignées DLD-1 et T84 produisent majoritairement l'isoforme clivée de CDP à 110 kDa avec une faible expression de la forme complète de CDP fusionnée à la protéine de fluorescence verte GFP dans les cellules T84. Par contre, les lignées Caco 2/15 et Colo 205 expriment les deux formes de CDP. La lignée HCT 116 ne produit pas la protéine EGFP-CDP.

**Figure 12. Détermination de l'expression de CDP exogène dans les différentes lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain.** (A) Schéma illustrant l'infection des cellules des lignées cancéreuses colorectales humaines avec les rétrovirus MSCV néo vide et MSCV néo EGFP-CDP menant à l'établissement de lignées stables qui surexpriment la protéine CDP fusionnée à la protéine de fluorescence verte GFP. (B) Site de clivage de la protéine CDP. La protéine CDP p200 est clivée entre les acides aminés 659 et 878 conduisant à la production de la forme clivée à 110 kDa, CDP p110. (C) 40 µg de protéines totales provenant de cinq lignées stables de cellules cancéreuses de côlon humain HCT 116, DLD1, Caco 2/15, T84 et Colo 205 ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Les cellules ont été infectées avec (1) le vecteur rétroviral vide MSCVnéo comme contrôle négatif et (2) le vecteur rétroviral MSCVnéo EGFP-CDP. Les 293T ont été utilisées comme contrôle positif. Le niveau d'expression basal de CDP dans ces cellules est représenté par la bande à 200 kDa. La bande à 110 kDa correspond à la forme issue du clivage protéolytique de CDP. La bande située au dessus de celle à 200 kDa dans les lignées Caco 2/15, Colo 205 et T84 représente la protéine de fusion EGFP-CDP. Un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP a été utilisé pour la détection des isoformes de 200 et de 110 kDa. Les niveaux d'actine ont été déterminés afin de s'assurer d'une quantité constante de protéines dans chacun des puits.

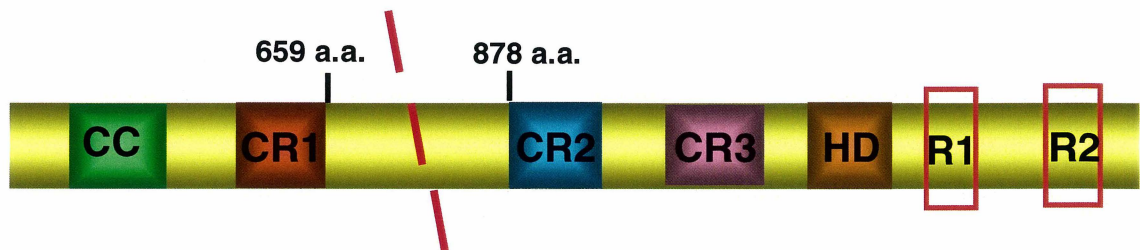
A

## Infection des cellules

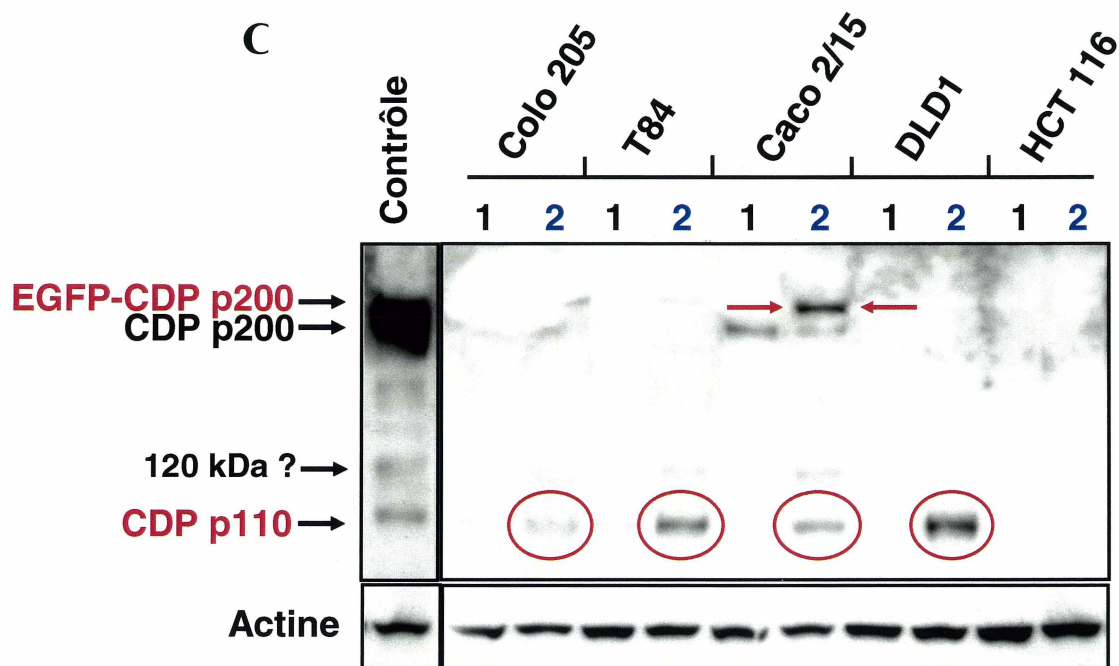


B

## Site de clivage menant à CDP p110



C



1: cellules infectées avec le rétrovirus MSCV néo (vecteur vide)

2: cellules infectées avec le rétrovirus MSCV néo EGFP-CDP

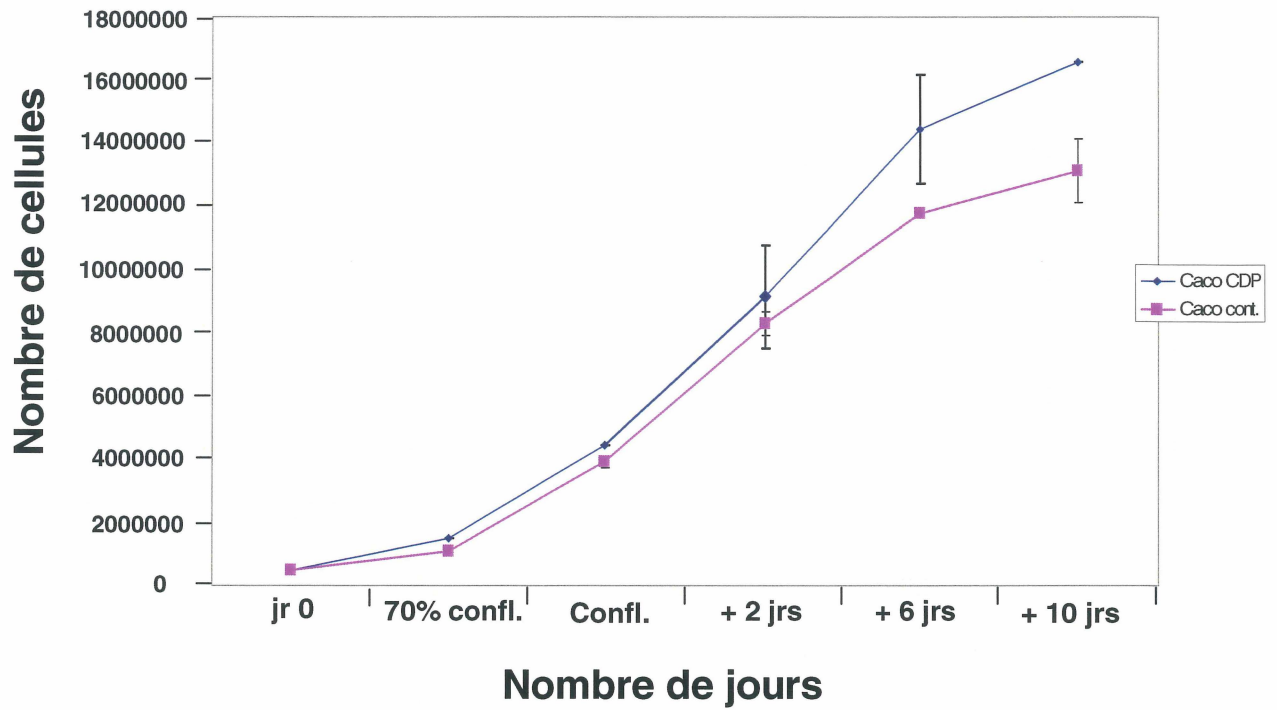
### 2.3 Caractérisation du comportement prolifératif de la lignée stable d'adénocarcinome de côlon humain Caco 2/15 qui surexprime CDP.

Puisque la lignée stable Caco 2/15 est la seule qui exprime les plus hauts niveaux de la protéine CDP p200 exogène, nous avons utilisé cette lignée afin de déterminer l'effet de CDP dans la prolifération cellulaire de ces cellules. Pour ce faire, un nombre de 500 000 cellules ont étéensemencées au jour 0 et les cellules ont été comptées pendant une cinétique de plusieurs jours par décompte cellulaire à l'aide d'un hémacytomètre. Les cellules en suspension ont été colorées au Trypan Bleu permettant ainsi une mesure de la viabilité de ces cellules. À notre grand étonnement, les résultats obtenus furent contradictoires à notre hypothèse de départ, soit que CDP p200 serait impliqué dans un ralentissement de la prolifération cellulaire. En effet, le graphique de la courbe de croissance des cellules Caco 2/15 CDP et contrôle montre qu'il y a une augmentation du rythme prolifératif en fonction du temps des cellules Caco 2/15 qui surexpriment la protéine CDP en comparant avec les cellules contrôles (Figure 13A). Afin de corrélérer l'expression de CDP en fonction du temps, les protéines totales ont été récoltées en parallèle et soumises à une analyse Western. Les résultats montrent que lorsque les cellules prolifèrent (70% confluence à + 6 jours), il y a beaucoup plus de production de la forme clivée avec une diminution d'expression de cette isoforme lorsque la prolifération des cellules cesse (+10 jours) (Figure 13B).

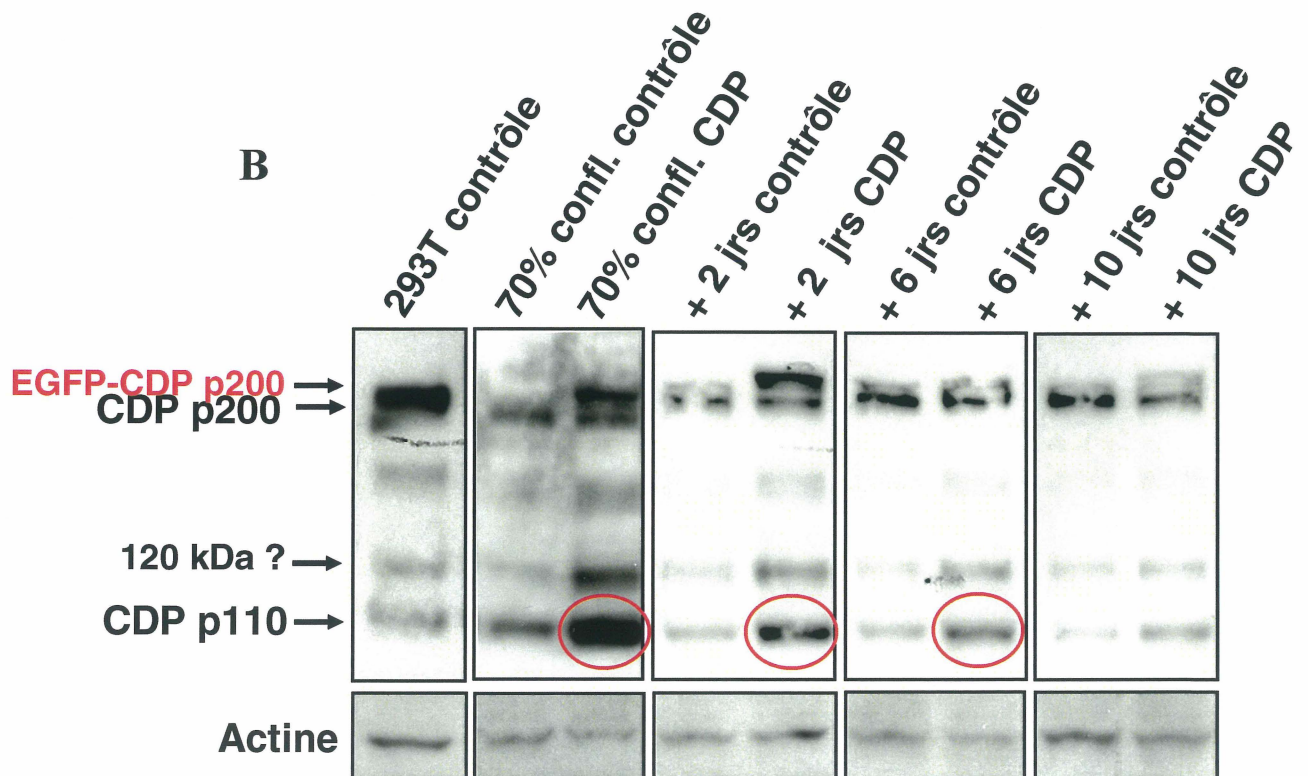
**Figure 13. Effet de la surexpression de CDP sur le comportement prolifératif des cellules de la lignée stable d'adénocarcinome de côlon humain Caco 2/15. (A) Courbe de croissance des cellules Caco 2/15 CDP et contrôle.** À jour 0, 500 000 cellules de la lignée Caco 2/15 qui surexpriment CDP et de la lignée contrôle ont été ensemencées et comptées à l'aide d'un hémacytomètre pendant une cinétique de plusieurs jours. Les cellules en suspension ont été colorées au bleu de Trypan afin de s'assurer de la viabilité des cellules comptées. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne avec le SEM (erreur standard sur la moyenne) pour chaque jour d'une expérience de dénombrement de trois à quatre échantillons. **(B) Analyse Western** utilisant 44 µg de protéines totales des cellules Caco 2/15 CDP et contrôle à 70% confluence et à jour 2, 6 et 10 post-confluence. Les cellules 293T ont été utilisées comme contrôle positif. La bande à 200 kDa représente le niveau d'expression basal de la protéine CDP endogène dans ces cellules et celle à 110 kDa correspond à la forme issue du clivage protéolytique de CDP. La bande située au dessus de celle à 200 kDa représente la protéine de fusion EGFP-CDP. Un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP a été utilisé pour la détection des isoformes de 200 et de 110 kDa. Les niveaux d'actine ont été déterminés afin de s'assurer d'une quantité constante de protéines dans chacun des puits.

A

### Courbe de croissance des cellules Caco 2/15 CDP et contrôle



B



## 2.4 Analyse de la stabilité de la protéine CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines.

Il a été démontré précédemment que les niveaux d'expression de l'ARN<sub>m</sub> de CDP dans les lignées d'adénocarcinomes de côlon humain sont relativement similaires à ceux des colonocytes fœtaux humains normaux (Figure 10). Il est donc probable que l'absence d'expression de CDP relève d'une instabilité de la protéine. En effet, il a été démontré que la majorité des protéines sont destinées à être dégradées via un mécanisme dépendant du protéasome (Passmore et Barford, 2004). Afin d'étudier cette possibilité, les deux lignées cancéreuses colorectales humaines T84 et Colo 205 ont été traitées préalablement avec des inhibiteurs de protéases : le MG132, un puissant inhibiteur de la sous-unité 20S du protéasome (Palombella *et al.*, 1994) et la calpeptine, un inhibiteur des cystéines protéases. Après 18 heures de traitement, les protéines totales ont été récoltées et analysées par immunobuvardage de type Western. Nous observons l'apparition d'une bande à 200 kDa correspondant à la forme complète de CDP dans les cellules T84 traitées au MG132 en comparaison avec le contrôle dans lequel les cellules ont été traitées seulement avec du DMSO, solvant ayant servi à diluer le MG132 (Figure 14A). Pour ce qui est du traitement avec la calpeptine, il y a également une augmentation de l'expression de CDP p200 chez les cellules T84 traitées avec l'inhibiteur par rapport aux cellules non traitées (Figure 14A). Le même phénomène est observé chez les cellules Colo 205 (Figure 14B). Par contre, de façon globale, l'augmentation de l'expression de la forme de 200 kDa n'est pas associée à une augmentation de la forme tronquée de 110 kDa suggérant ainsi que le mécanisme dépendant du protéasome sur la stabilité de CDP est indirect.

## 2.5 Détermination de l'expression de CDP dans les polypes coloniques de souris

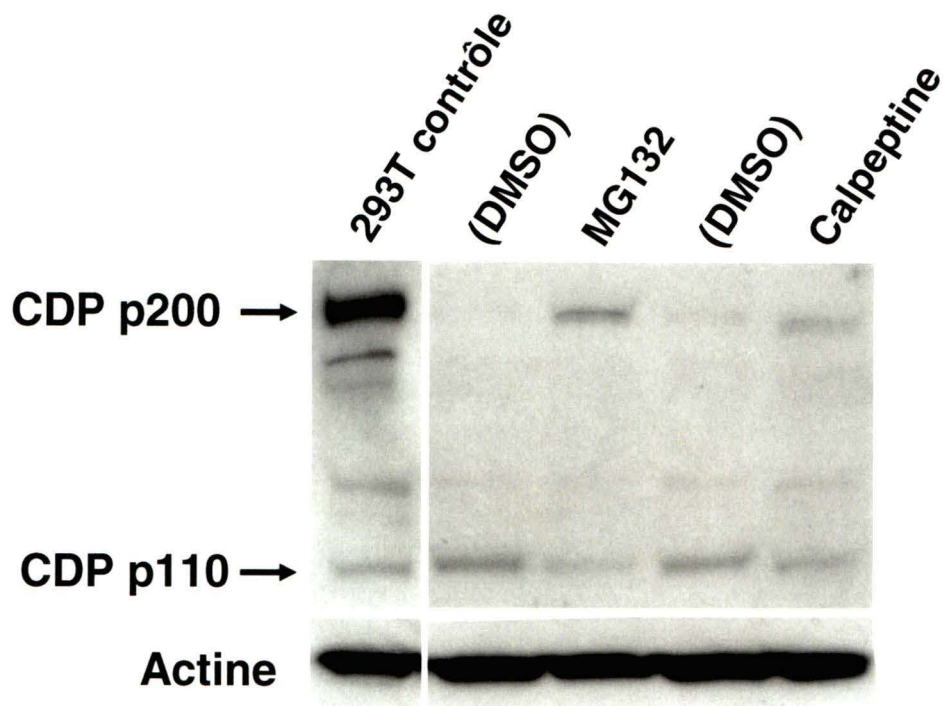
### APC/Min

Puisque la majorité des lignées cancéreuses colorectales humaines expriment CDP p110 et que cette isoforme est impliquée dans une augmentation du rythme prolifératif, nous avons étudié l'existence d'un lien possible entre l'expression de CDP et les pathologies coloniques. Pour ce faire, le modèle murin APC/Min (*Adenomatous polyposis coli/Multiple intestinal neoplasia*) a été utilisé afin de vérifier le rôle potentiel de CDP dans le cancer colorectal. Ces souris ont la particularité de développer de façon spontanée plusieurs polypes dans l'intestin grêle et très rarement dans le côlon (Oshima *et al.*, 1995). Elles représentent donc un bon modèle pour l'étude de l'initiation de la tumorigénèse de l'épithélium intestinal. (Sancho *et al.*, 2004). Suite au sacrifice de deux souris APC/Min, une polype colonique a été prélevée dans chaque souris et une marge de résection a été microdissectée en parallèle dans un des animaux. Les protéines totales ont été récoltées et analysées par immunobuvardage de type Western. Les résultats démontrent l'expression de la forme clivée de CDP à 110 kDa dans les polypes coloniques alors que la marge de résection colonique exprime exclusivement la forme complète de CDP (Figure 15). Ce résultat préliminaire suggère un clivage de CDP p200 au cours des événements moléculaires menant à l'initiation du cancer colorectal.

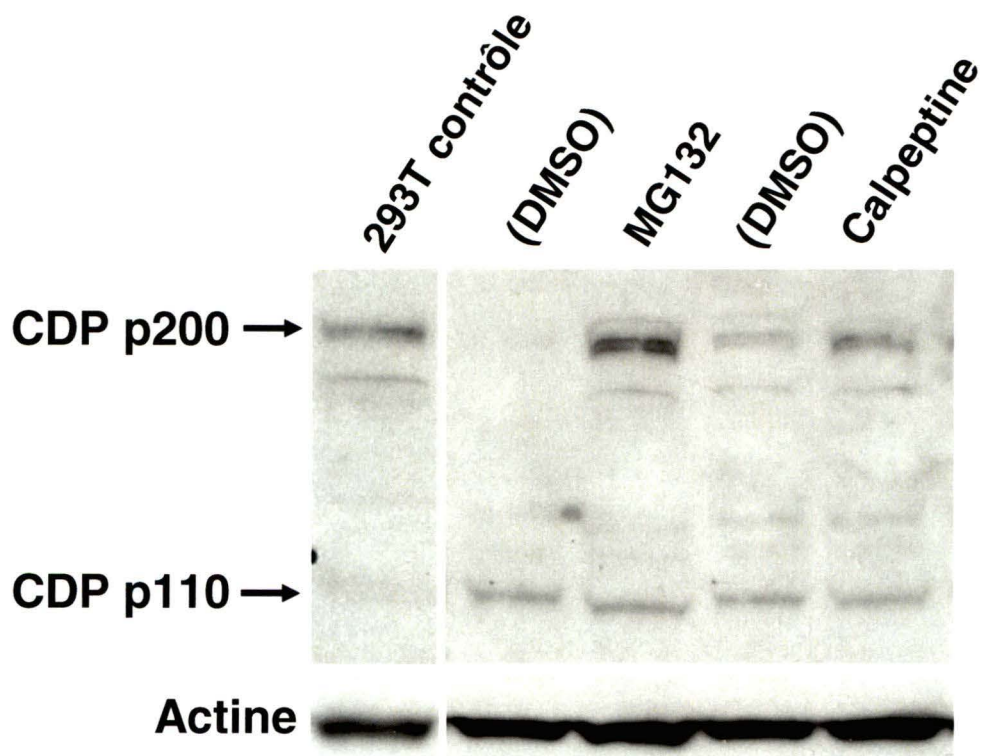


**Figure 14. Effet des inhibiteurs de protéases sur la stabilité de la protéine CDP** dans les lignées cancéreuses colorectales humaines T84 et Colo 205. Deux lignées d'adénocarcinomes de côlon humain T84 (A) et Colo 205 (B) ont été traitées avec 25µM de MG132 et 50µM de calpeptine. Les cellules contrôles ont été traitées avec un volume équivalent de solvant ayant servi à diluer le MG132 et la calpeptine, soit du DMSO dans les deux cas. Après 18 heures de traitement, les protéines totales ont été récoltées et ont été soumises à un immunobuvardage de type Western. Les cellules 293T ont été utilisées comme contrôle positif. La bande à 200 kDa représente l'expression endogène de la protéine CDP et celle à 110 kDa, la forme clivée. Un anticorps polyclonal contre le domaine C-terminal de CDP a été utilisé pour la détection des isoformes de 200 et de 110 kDa de CDP. Les niveaux d'actine ont été déterminés afin de s'assurer d'une quantité constante de protéines dans chacun des puits.

### A Lignée T84

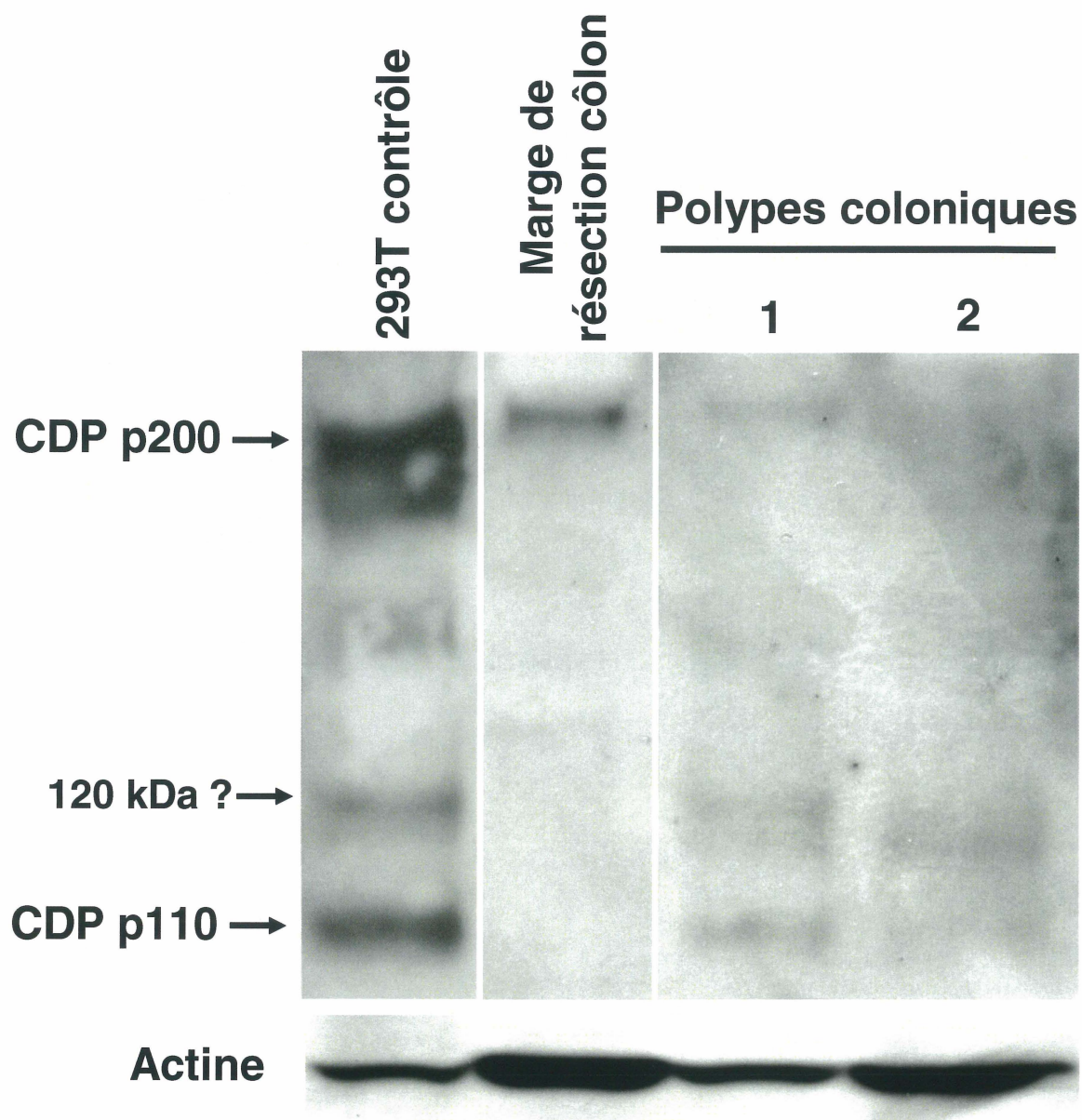


### B Lignée Colo 205



**Figure 15. Expression de CDP dans les polypes coloniques de souris APC/Min.**

Les polypes coloniques de souris APC/Min ont été prélevés suite au sacrifice des souris. Les protéines totales ont été récoltées et soumises à une analyse par immunobuvardage de type Western. Les cellules 293T qui expriment de façon endogène CDP p200 et CDP p110 ont été utilisées comme contrôle positif. Les deux isoformes de CDP ont été détectées par l'utilisation d'un anticorps polyclonal contre l'extrémité C-terminale de CDP.



## IV-Discussion

### 1. Le gène PLZF est une cible du facteur de transcription CDP dans le contexte de l'épithélium intestinal.

Des études antérieures ont démontré un rôle du facteur de transcription CDP dans la répression colonique du gène de la sucrase-isomaltase (SI) (Boudreau *et al.*, 2002). Étant donné que la fonction physiologique de cette protéine dans le côlon est encore inconnue jusqu'à ce jour, le présent travail a permis d'étudier l'implication de CDP dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal colonique. Tout d'abord, des micropuces à ADN utilisant le modèle murin mutant en CDP ont permis d'identifier PLZF comme gène cible de CDP dans le côlon. Une analyse par PCR quantitatif en temps réel a été effectuée afin de valider une augmentation des niveaux d'expression du messager de PLZF dans le côlon des souris homozygotes par rapport à celui des souris hétérozygotes et de type sauvage. L'analyse du résultat des micropuces à ADN montre une augmentation de dix fois des niveaux d'expression de l'ARN<sub>m</sub> de PLZF alors que le PCR quantitatif en temps réel indique que l'expression du messager de PLZF est augmentée de seulement trois fois. La différence entre les deux méthodes s'explique par le fait que le criblage par micropuces à ADN n'est pas une étude statistique; cette méthode a utilisé un mélange d'ARN provenant de trois individus. Par contre, le graphique du ratio normalisé PLZF/TBP en fonction du génotype des souris à jour 1 post-natal compare les niveaux d'expression du messager de PLZF dans le côlon d'une souris homozygote, d'une souris hétérozygote et d'une souris de type sauvage. Il sera donc primordial de répéter cette expérience en augmentant le nombre d'individus à l'étude afin de réaliser une analyse statistique. Ensuite, une analyse

informatique du gène PLZF a prédit 21 sites potentiels d'interaction pour le facteur CDP. À partir de ces informations, nous avons caractérisé l'interaction du facteur de transcription CDP avec le gène PLZF dans l'épithélium colanique. Plusieurs approches ont été utilisées afin de mettre en évidence une régulation possible de l'expression du gène PLZF par CDP. D'abord, les résultats des essais luciférase démontrent une interaction fonctionnelle de CDP avec le gène PLZF. Ceci se traduit par une diminution d'environ deux fois et de plus de trois fois de l'activité transcriptionnelle de la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF par Cux et CDP dans les 293T et par CDP dans la lignée d'adénocarcinome de côlon humain T84 respectivement. Dans les deux cas, cette réduction significative peut s'expliquer en partie par la présence de plusieurs sites potentiels de liaison pour le facteur CDP dans cette région comparativement aux régions de 1,9 kb (deux sites), 2,0 kb (cinq sites), 1,8 kb (trois sites) et 2,9 kb (trois sites) qui en contiennent moins. Le mécanisme exact utilisé par CDP pour diminuer l'activité transcriptionnelle via la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF demeure inconnu. Une analyse de la séquence du gène PLZF (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI) numéro d'accès : AF060568) montre que cette portion est localisée dans la région non traduite à l'extrémité 5' (5'-UTR : *untranslated region*). Il a été démontré dans la littérature que cette région non traduite contient certains éléments qui jouent un rôle dans le contrôle de la régulation de la transcription des gènes (Burkhardt *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Ibla *et al.*, 2006). Dans notre cas, un mécanisme possible pourrait mener en un blocage allostérique de CDP par sa liaison à la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF et ainsi limiter la liaison de l'ARN polymérase II sur la boîte TATA. Ce mécanisme pourrait ainsi prévenir la synthèse du messager (ARNm) et, par conséquent, de la protéine PLZF. De plus, il est possible que la liaison de plusieurs molécules CDP sur

la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF puissent résulter en un blocage physique du passage de la polymérase. La séquence du gène PLZF montre également des sites de liaison pour le facteur de transcription activateur GATA localisés à proximité des sites de liaison de CDP. Il a été démontré que CDP compétitionne avec GATA 4 dans la répression du gène de la sucrase-isomaltase (SI) dans le côlon (Boudreau *et al.*, 2002). Afin de déterminer l'existence d'une interaction fonctionnelle de GATA avec cette portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF, il sera essentiel d'effectuer des essais luciférase en co-transfectant un vecteur d'expression pour la protéine GATA et la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF couplée au gène rapporteur de la luciférase. Ceci permettra également de démontrer si CDP a la capacité de diminuer l'activité transcriptionnelle de cette portion du gène PLZF en empêchant la liaison de GATA. Ensuite, le vecteur utilisé dans les essais de co-transfections réalisés dans les 293T et dans les cellules cancéreuses T84 produit une protéine humaine CDP fusionnée à une protéine de fluorescence verte (GFP : *green fluorescent protein*). Le facteur CDP étant naturellement une protéine d'un poids moléculaire relativement élevé (200 kDa), l'encombrement stérique apporté par la protéine GFP pourrait interférer avec les propriétés de CDP. Cependant, les essais luciférase effectués dans les cellules 293T et utilisant le vecteur CMV-Cux qui permet la production de l'homologue murin de CDP, soit Cux, montrent une diminution semblable de l'activité transcriptionnelle de la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Donc, la protéine de fluorescence verte ne vient pas modifier l'effet de CDP sur l'activité transcriptionnelle de la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF. Puisque nous savons que la boîte TATA se situe à environ 5500 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Zhang *et al.*, 1999), notre analyse prédit donc huit sites potentiels d'interaction pour CDP dans la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF et onze sites potentiels d'interaction sur une région de 6,7 kb

de la région promotrice du gène PLZF. Afin de vérifier si la région en amont de la boîte TATA est impliquée dans la régulation négative de l'activité transcriptionnelle du gène PLZF par CDP, il sera primordial de compléter le clonage des portions amplifiées du gène PLZF dans le vecteur rapporteur luciférase. Nous pourrions ainsi vérifier l'effet de CDP sur l'activité transcriptionnelle de ces portions. Il est à noter que l'isoforme produite suite à la co-transfection du vecteur pEGFP-CDP dans les cellules 293T et T84 et du vecteur CMV-Cux dans les 293T peut être la forme complète de CDP (CDP p200) ou la forme clivée à 110 kDa. Il sera intéressant de construire un mutant de la protéine CDP non clivable et une version de CDP p110 et ainsi effectuer d'autres essais luciférase afin de déterminer l'isoforme à l'origine de la diminution de l'activité transcriptionnelle du gène PLZF.

Les études par gel de rétention ont permis de suggérer de façon complémentaire l'existence d'une régulation possible du gène PLZF par CDP. En effet, les résultats montrent que CDP a la capacité de se lier à cinq sites sur huit sites dans la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF, soit les sites # 1, 3, 4, 6 et 7. Cependant, l'utilisation d'une protéine purifiée GST fusionnée à seulement deux domaines de la protéine CDP (les domaines CR3 et HD) n'est pas représentative de la protéine complète et n'exclue pas le fait qu'il est possible que les autres domaines puissent interagir avec plus de sites ou d'autres sites. Afin de remédier à cette problématique, il sera sage d'utiliser la protéine complète CDP purifiée à partir d'un vecteur d'expression TapTag CDP dans les essais de gels de rétention. De plus, il est possible de remarquer que la longueur des oligonucléotides utilisés est courte limitant peut-être la formation de complexes entre CDP et l'ADN. Cette constatation peut expliquer en partie le plus faible rendement de formation de complexes ADN-protéine. Cependant, il est à noter que



l'utilisation d'une protéine purifiée GST-CR3HD a néanmoins permis de détecter une interaction. Il sera nécessaire d'utiliser des oligonucléotides beaucoup plus longs et qui englobent plus d'un site pour ainsi augmenter les probabilités de formation de complexes entre CDP et l'ADN. Ensuite, nos résultats mettent en évidence la liaison potentielle de CDP avec certains sites de la portion de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF dans une situation *in vitro*. Cependant, nous ne savons pas si CDP possède la capacité de lier le gène PLZF dans le contexte de la chromatine dans la cellule. Afin de répondre à cette question, il sera important de valider l'interaction de CDP avec la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF *in vivo* par un essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Une analyse du profil d'expression des protéines CDP et PLZF dans différentes lignées cancéreuses de côlon humain et de colonocytes isolés du tissu de côlon fœtal sain a permis d'établir une corrélation entre l'expression de la protéine PLZF et l'expression du facteur CDP *in vivo*. En effet, les résultats de l'analyse Western montrent que l'isoforme complète de CDP est exprimée dans le tissu normal de côlon fœtal humain alors que la protéine PLZF n'est pas détectée tandis que dans la majorité des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain, CDP p200 n'est pas détectée alors que PLZF est fortement exprimée. Ceci met en évidence un patron d'expression réciproque entre les cellules qui expriment CDP et celles qui expriment PLZF. L'expression de CDP dans le côlon fœtal humain sain corrobore un résultat antérieur démontrant que la protéine CDP est exclusivement exprimée dans l'épithélium de l'iléon et du côlon proximal chez la souris adulte (Boudreau *et al.*, 2002). La seule lignée dans laquelle CDP p200 est détectable de façon significative est la lignée Caco 2/15. Les cellules de cette lignée sont les seules à présenter la particularité d'être

prolifératives à sous-confluence et d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence (Beaulieu et Quaroni, 1991). Il est donc possible que l'expression de CDP dans cette lignée change en fonction de la confluence des cellules. Cette observation semble se vérifier dans l'expérience qui permet de déterminer l'effet de la surexpression de CDP sur le comportement prolifératif de la lignée stable Caco 2/15 (Figure 13). De plus, l'expression relative de CDP p200 dans les Caco 2/15 par rapport aux autres lignées corrèle avec une diminution d'expression de la protéine PLZF dans cette même lignée en comparaison avec les autres lignées dans lesquelles les niveaux d'expression de PLZF sont plus élevés. Le fait que la protéine PLZF ne soit pas détectable dans le tissu sain de côlon fœtal humain dépend peut-être de la méthode employée pour recueillir les cellules épithéliales. En effet, l'utilisation du Matrisperse qui est une solution permettant le détachement de façon non enzymatique des cellules épithéliales n'a peut-être pas permis de récolter les cellules ancrées dans le fond des cryptes. Dans le but de remédier à cette problématique, il sera intéressant d'investiguer une autre technique telle que l'immunohistochimie ou encore l'hybridation *in situ* afin de confirmer la localisation de l'expression de PLZF dans l'épithélium intestinal. De plus, il sera primordial d'élucider le rôle de PLZF dans le côlon pour ainsi mieux comprendre la régulation potentielle du gène PLZF par le facteur CDP. La détermination du profil d'expression de la protéine et du messager de CDP et de PLZF dans le côlon au cours du développement chez la souris permettra de mettre en évidence l'impact d'une régulation du gène PLZF par le facteur CDP sur le développement du côlon chez la souris. De plus, des évidences dans la littérature ont démontré que la protéine PLZF est impliquée dans le maintien des cellules spermatogoniales (Costoya *et al.*, 2004). Puisque nos résultats obtenus par la technique de Weiser montrent que l'expression de

la forme de CDP p200 diminue dans les cellules localisées dans le fond des cryptes et que la forme de 110 kDa n'est pas détectée, il sera indispensable de déterminer l'expression de la protéine PLZF dans les cellules situées au bas des cryptes.

## **2. Le facteur de transcription CDP est impliqué dans la prolifération épithéliale colonique et dans la progression du cancer colorectal.**

Tout d'abord, le fractionnement des cellules épithéliales cryptales du côlon de souris adultes par la technique de Weiser a permis de démontrer que la forme complète de CDP à 200 kDa est majoritairement exprimée dans les cellules de la crypte du côlon avec une diminution d'expression dans les cellules retrouvées près de la base des cryptes. Ce résultat est en accord avec les expérimentations antérieures par immunolocalisation tissulaire qui montrent un gradient d'expression ascendant de CDP le long de l'axe vertical de la crypte colonique chez la souris adulte (Boudreau *et al.*, 2002). Par contre, l'expression constante de la protéine p27 dans l'ensemble des fractions cellulaires démontre que la technique n'a pas permis le détachement complet des cellules ancrées dans le fond de la crypte, celles localisées à la base même des cryptes. Cependant, une analyse d'immunobuvardage de type Western effectuée avec des fractions coloniques dont la dernière fraction fut récoltée avec une agitation supplémentaire de 15 minutes, ne montre toujours pas d'expression de la forme p110 de CDP (résultats non montrés). Cette analyse confirme de façon définitive que CDP p110 n'est exprimée en aucun temps dans les cellules coloniques de l'épithélium normal adulte de la souris.

La génération de lignées stables d'adénocarcinomes de côlon humain qui surexpriment la protéine CDP a permis d'approfondir le rôle de CDP au niveau des

cellules de l'épithélium colonique. Les résultats de l'analyse Western montrent que l'expression de la protéine CDP exogène varie selon la lignée. En effet, la forme clivée de CDP se trouve majoritairement produite dans les lignées T84 et DLD1, alors que les lignées Colo 205 et Caco 2/15 expriment principalement les deux isoformes de CDP. Les cellules de la lignée HCT 116 ne produisent pas de protéine CDP. Cette lignée est dérivée d'un carcinome de côlon humain et c'est elle qui est la plus transformée (Brattain *et al.*, 1981): elle possède une mutation dans le codon 45 du gène codant pour la  $\beta$ -caténine (Sekine *et al.*, 2002). Cette mutation entraîne une accumulation de  $\beta$ -caténine endogène résultant en une activation constante de la voie du Wnt (Gregorieff et Clevers, 2005). Il est à noter que l'absence d'expression de la protéine CDP dans cette lignée n'indique pas que l'infection n'a pas fonctionné, car il y a des cellules qui ont résisté à l'antibiotique utilisé, donc qui ont intégré l'ADN dans leur génome. Il sera donc essentiel de déterminer le niveau d'expression de l'ARN<sub>m</sub> de CDP dans cette lignée ainsi que de vérifier la stabilité de la protéine en utilisant un inhibiteur du protéasome, soit le MG132. Ceci permettra d'établir un lien possible entre l'activation de la voie du Wnt et la stabilité de la protéine CDP dans cette lignée. D'autre part, la lignée T84 exprime faiblement la forme complète de CDP et la forme clivée peut être également détectée faiblement, mais plus fortement par rapport au contrôle, dans les lignées Caco 2/15 et Colo 205. Il est probable que la production de la grande et de la petite forme de CDP change en fonction de la confluence des cellules, les cellules étant à une confluence d'environ 95% au moment de la récolte des protéines. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'immunobuvardage de type Western effectué en parallèle avec les décomptes cellulaires (Figure 13). La bande supplémentaire située au dessus de celle à 110 kDa correspond peut-être à une autre forme clivée de CDP non caractérisée à ce jour. De plus, l'augmentation de

l'expression de la forme à 110 kDa dans toutes les lignées en comparaison avec le contrôle suggère que la cellule cancéreuse clive très rapidement la protéine pEGFP-CDP exogène pour générer la forme tronquée laquelle accentue peut-être le rythme prolifératif de la cellule. Les résultats obtenus par décomptes cellulaires montrent que la protéine CDP contribue à une prolifération accrue d'un modèle de cellules cancéreuses de côlon humain lequel exprime les plus hauts niveaux de la protéine exogène pEGFP-CDP, soit la lignée Caco 2/15. En effet, l'implication de CDP dans la prolifération cellulaire et dans la progression du cycle cellulaire a fait l'objet de certaines études dans la littérature (van Wijnen *et al.*, 1996; Coqueret *et al.*, 1998; Truscott *et al.*, 2003). Puisque CDP est un répresseur transcriptionnel de plusieurs gènes, nous avons émis l'hypothèse que CDP serait impliqué dans un ralentissement de la prolifération cellulaire. Cependant, l'analyse du graphique représentant la courbe de croissance des cellules Caco 2/15 CDP et contrôle montrent une augmentation du rythme prolifératif des cellules Caco 2/15 qui surexpriment CDP par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation de la prolifération pourrait s'expliquer par une production beaucoup plus grande de la forme tronquée de CDP à 110 kDa dans la période de temps pendant laquelle les cellules prolifèrent tel que déterminé par analyse Western. Cette interprétation coïncide avec l'étude de Sansregret *et al.* en 2006. En effet, une augmentation de la prolifération des cellules qui surexpriment la petite forme a été démontrée par l'utilisation d'une lignée stable de cellules fibroblastiques de souris qui surexpriment l'isoforme de 110 kDa de CDP (Sansregret *et al.*, 2006). Puisque des évidences dans la littérature ont montré que CDP p110 active la transcription des gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire (Truscott *et al.*, 2003), ils ont également établi que CDP p110 modulait la prolifération cellulaire en stimulant l'expression de deux régulateurs du cycle

cellulaire, soit la cycline A2 et la cycline E2. Nos résultats tirent une originalité de l'utilisation de lignées cancéreuses colorectales humaines pour l'étude du lien entre l'expression de la forme clivée de CDP et le comportement prolifératif de ces lignées. En effet, malgré le potentiel prolifératif déjà très élevé des cellules cancéreuses colorectales humaines, la production de CDP p110 suite au clivage de CDP p200 exogène réussit quand même à augmenter la vitesse de prolifération de ces cellules. Afin de déterminer si l'expression de CDP p110 est une cause ou une conséquence de l'augmentation du rythme prolifératif observée, il sera capital de surexprimer la forme tronquée de CDP dans les différentes lignées d'adénocarcinomes de côlon humain et de déterminer l'effet sur la prolifération cellulaire. De plus, puisque la majorité des lignées cancéreuses colorectales humaines présentent une dérégulation au niveau de la voie du Wnt, il sera envisageable de déterminer si CDP p110 accroît le rythme prolifératif des cellules en augmentant l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine.

Un lien cellulaire entre l'expression de CDP et le potentiel invasif des cellules cancéreuses en général fut argumenté par les travaux de Michl et collaborateurs en 2005. En effet, cette équipe a démontré une implication de CDP dans l'augmentation de la migration, de la motilité et de l'invasion des cellules *in vitro* et *in vivo* (Michl *et al.*, 2005). De plus, les auteurs démontrent qu'il s'agit d'un effet dépendant du TGF $\beta$  et des voies Smad et de p38MAPK. En effet, il y a induction de l'expression de CDP après 4 heures de stimulation au TGF $\beta$  (Michl *et al.*, 2005; Michl et Downward, 2006). Récemment, cette équipe de recherche a également démontré que la PKA (protéine kinase A) phosphoryle la sérine 1215 de Cutl1 dans la lignée fibroblastique NIH 3T3 résultant en une diminution de la prolifération et de la migration des cellules (Michl *et al.*, 2006). Par contre, ces études ne mentionnent pas s'il s'agit de

l'isoforme de 110 ou de 200 kDa qui est à l'origine de l'augmentation de la migration et de l'invasion observées dans les lignées cancéreuses. De plus, Michl et ses collaborateurs ont effectué leurs études dans des lignées cellulaires de nature différente telles les NIH3T3 (fibroblastes de souris), les HT 1080 (fibrosarcomes) et les MDA-MB-231 (cellules cancéreuses de sein). Il serait intéressant de vérifier l'effet de CDP sur la migration, la motilité et l'invasion des cellules de provenance de cancer colorectal telles que les cellules Caco 2/15 qui surexpriment ou non CDP dans les lignées stables établies. Une induction de blessure sur une monocouche de cellules en culture, des essais de migration entre deux chambres (*two-chamber migration assay*) et de la microscopie *time-lapse video* pourraient ainsi clarifier ce rôle potentiel dans le cancer colorectal.

Une seule étude à ce jour a permis d'identifier une voie protéolytique impliquée dans le clivage de CDP p200 en CDP p110 (Goulet *et al.*, 2004). En effet, la cathepsine L peut transloquer au noyau et ainsi processor CDP en des sites bien précis pour produire CDP p110 (Goulet *et al.*, 2004). Nos études ont permis d'identifier une nouvelle voie intracellulaire impliquée dans la stabilité de CDP p200. Tout d'abord, nous avons démontré par PCR quantitatif en temps réel que les niveaux d'expression du messager de CDP dans les lignées cancéreuses colorectales humaines sont relativement comparables à ceux des colonocytes fœtaux humains normaux de 19 semaines. Ce résultat montre que les niveaux d'expression de l'ARN<sub>m</sub> de CDP ne sont pas diminués dans ces lignées même si la protéine complète CDP n'est pas détectée et que la forme tronquée est tout de même exprimée. Ceci indique que c'est la stabilité de la protéine CDP qui est affectée et que ça ne résulte pas d'un événement épigénétique au niveau du gène. En effet, les cellules traitées avec un inhibiteur du

protéasome, soit le MG132 et avec un inhibiteur des cystéines protéases, soit la calpeptine montrent une apparition de la bande à 200 kDa par rapport aux cellules contrôles autant chez les cellules T84 que chez les cellules Colo 205. Cependant, il n'y a pas de sur-accumulation de la forme de 110 kDa lors du même traitement suggérant que le mécanisme passant par la voie de dégradation via le protéasome est indirect. Notre hypothèse est que le MG132 inhiberait une protéase laquelle inactiverait la cathepsin L qui à son tour serait incapable de cliver CDP p200 en CDP p110. Ceci aurait alors comme conséquence de mener à l'accumulation de la forme complète de CDP au détriment de la forme tronquée. En effet, il a été démontré que la production de CDP p110 provient d'un processing de CDP p200 et non pas de la présence d'un deuxième site d'initiation de la traduction dans le messenger de CDP (Moon *et al.*, 2001). Il est à noter que le traitement de la lignée stable DLD-1 qui surexprime CDP avec un inhibiteur de la cathepsine L, soit le benzyloxycarbonyl-phenylalanine-alanine diazométhane (z-Phe-Ala-CHN<sub>2</sub>), montre une accumulation subtile de CDP p200 couplée à une diminution de CDP p110 (résultats non montrés). Cette réduction de l'expression de CDP p110 n'est cependant pas totale et indique l'implication d'autres mécanismes et/ou d'autres protéases. En effet, il a également été démontré par l'équipe de Nepveu que d'autres protéases étaient efficaces dans le clivage de CDP p200 en CDP p110, soit les cathepsines F, K et V (Goulet *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant de traiter les cellules cancéreuses T84 et Colo 205 avec les inhibiteurs spécifiques de ces différentes cathepsines afin de déterminer s'il s'agit d'un mécanisme compensatoire. Afin de confirmer le rôle de la cathepsine L, il sera important de muter le site de clivage spécifique de la cathepsine L dans CDP et d'utiliser des lignées cellulaires déficientes en l'activité cathepsine L maintenant disponibles dans le laboratoire.



D'autre part, le système de dégradation via le protéasome est un mécanisme très complexe et seules les protéines polyubiquitinées sont destinées à être envoyées vers le protéasome pour une éventuelle dégradation (Wolf et Hilt, 2004). En effet, l'attachement d'une ubiquitine, petit polypeptide de 76 acides aminés sur la protéine cible, se fait via une cascade enzymatique impliquant trois enzymes (Desterro *et al.*, 2000; Glickman et Ciechanover, 2002). L'enzyme E1 active l'ubiquitine selon une réaction ATP-dépendante; elle est suivie par une réaction de conjugaison catalysée par l'enzyme E2 qui transfère l'ubiquitine activée sur un résidu lysine de la protéine cible liée de façon spécifique à une enzyme ligase E3; l'enzyme E2 peut également transférer l'ubiquitine sur un résidu cystéine d'une enzyme ligase E3 qui elle se charge du transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible. Enfin, l'enzyme E4 s'occupe de l'élongation de la chaîne d'ubiquitines afin de donner naissance à une protéine polyubiquitinée qui est reconnue par le protéasome 26S. Le protéasome 26S est une protéase multicatalytique composée de deux sous-unités, soit la sous-unité 19S responsable de la reconnaissance de la protéine polyubiquitinée, du dépliement de la protéine et de son entrée dans la sous-unité 20S. Cette dernière assure une dégradation des protéines polyubiquitinées en petits peptides. Il existe plusieurs modes de reconnaissance des protéines cibles destinées à la dégradation via le protéasome (Glickman et Ciechanover, 2002). Des modifications post-traductionnelles tant sur la protéine cible que sur la ligase E3 peuvent être nécessaires à l'activation de l'ubiquitination. Par exemple, la phosphorylation des protéines peut augmenter leur ubiquitination et la glycosylation empêcher leur ubiquitination. Dans notre cas, il serait très intéressant d'aller vérifier d'une part la présence d'ubiquitines sur les résidus lysines de la protéine CDP dans les lignées T84 et Colo 205 traitées au MG132. D'autre part, des évidences dans la littérature ont démontré la présence de

plusieurs modifications post-traductionnelles sur CDP. Par exemple, il a été mis en évidence que la protéine kinase C (PKC) (Coqueret *et al.*, 1996) et la caséine kinase II (CKII) (Coqueret *et al.*, 1998) phosphorylent des acides aminés spécifiques dans les domaines CR1, CR2 et CR3 de CDP. Il serait également cohérent d'étudier l'état de phosphorylation de CDP et la présence de ces deux protéines kinases dans les cellules T84 et Colo 205.

Enfin, l'expression non détectable de CDP p200 dans la plupart des cellules cancéreuses de côlon humain et l'implication de la forme clivée dans l'augmentation de la prolifération des cellules Caco 2/15 qui surexpriment CDP établissent peut-être un lien entre l'expression de CDP et l'état cancéreux de l'épithélium colonique. En effet, aucune évidence à ce jour n'attribue une implication de CDP dans le cancer colorectal. Cependant, il a été démontré que plusieurs cancers de l'utérus expriment CDP p200 en plus de deux isoformes issues du clivage protéolytique de la grande forme, soit CDP p110 et CDP p100 (Moon *et al.*, 2002). De plus, une isoforme de CDP de 75 kDa générée à partir d'un second site d'initiation de la traduction et qui résulte en une interaction plus stable avec l'ADN que la forme de 110 kDa est retrouvée dans plusieurs cancers du sein (Goulet *et al.*, 2002). Une analyse Western a permis d'observer une expression des isoformes clivées de CDP dans les deux polypes coloniques provenant de souris APC/Min. La forme de CDP p200 est retrouvée exclusivement dans la marge de résection avec une absence totale d'expression de CDP p110. Bien que le développement des polypes coloniques est une des premières étapes menant au cancer colorectal et qu'elles sont souvent asymptomatiques dans la plupart des cas (Arends, 2000, Hardy *et al.*, 2000), ce résultat suggère une implication potentielle de la forme clivée de CDP dans l'initiation du cancer colorectal. Il sera

donc primordial de déterminer le profil d'expression des isoformes de CDP dans les pathologies intestinales humaines telles que le cancer colorectal.

## V-Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces travaux a permis d'approfondir l'implication de CDP dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal colonique. D'abord, le gène PLZF a été identifié comme cible transcriptionnelle de CDP dans le contexte de l'épithélium colonique par l'utilisation de micropuces à ADN. Une prédiction informatique a montré que ce gène possède 21 sites potentiels de liaison pour le facteur CDP. La caractérisation de l'interaction potentielle entre la protéine CDP et le gène PLZF a permis de déterminer que CDP a la capacité de se lier sur les sites # 1, 3, 4, 6 et 7 dans la région de 3 kb 5'-UTR du gène PLZF résultant en une diminution de son activité transcriptionnelle. De plus, il existe une corrélation entre le patron d'expression de la protéine CDP et celui de la protéine PLZF dans les cellules. En effet, l'isoforme CDP p200 n'est pas détectée dans la majorité des lignées cancéreuses colorectales humaines alors que la protéine PLZF est fortement exprimée. Dans les colonocytes fœtaux humains normaux, il y a expression de CDP p200 tandis que PLZF n'est pas détectée. En ce qui concerne l'étude du rôle de CDP dans le côlon et dans les pathologies coloniques, les données cumulées ont permis de mettre en évidence des propriétés spécifiques à chacune des isoformes. En effet, il y a une expression différentielle de CDP p200 le long de l'axe vertical de la crypte colonique chez la souris adulte, cette isoforme se retrouve dans les colonocytes fœtaux humains normaux et il semble que la voie de dégradation via le protéasome déstabilise cette isoforme de 200 kDa. Il sera donc capital de déterminer avec exactitude les mécanismes et les protéases impliqués dans la stabilité de la protéine CDP p200. La forme de 110 kDa, quant à elle, est exprimée dans la majorité des lignées d'adénocarcinomes de côlon humain, elle semble promouvoir la prolifération cellulaire dans un contexte colorectal et elle

apparaît dans les polypes coloniques d'un modèle murin utilisé pour l'étude de la tumorigénèse de l'épithélium intestinal. L'approfondissement de ce résultat préliminaire et l'investigation de la voie du protéasome nous mèneront vraisemblablement à l'identification d'un ou de plusieurs inhibiteurs à utiliser afin de limiter la production de la forme clivée de CDP dans les pathologies coloniques humaines telles que le cancer colorectal.

Finalement, plusieurs avenues restent à être explorées concernant l'étude de la fonction du facteur de transcription CDP dans l'épithélium colonique. Il est capital d'investiguer l'importance du lien moléculaire entre CDP et PLZF. Des évidences dans la littérature ont démontré que PLZF joue un rôle dans le maintien des cellules souches spermatogoniales (Costoya *et al.*, 2004); les testicules sont plus petits chez les souris mutantes en PLZF (Buaas *et al.*, 2004). Il a également été démontré qu'il y a une diminution de l'expression de l'ARNm de PLZF lors de la différenciation des cellules hématopoïétiques (Reid *et al.*, 1995) et que l'expression du messager de PLZF est augmenté pendant la différenciation ostéogénique (Ikeda *et al.*, 2005). Ceci suggère une implication de PLZF dans la différenciation cellulaire. De plus, il a été démontré que les souris mutantes en CDP présentent des problèmes au niveau du système hématopoïétique (Sinclair *et al.*, 2001) et de la spermatogénèse (Luong *et al.*, 2002). Donc, par l'utilisation d'un modèle murin déficient pour la protéine CDP, il serait intéressant de déterminer les niveaux d'expression du messager de PLZF dans les testicules, la moëlle osseuse et le thymus afin d'établir une corrélation entre régulation de PLZF par CDP et les pathologies. Puisque le rôle de PLZF dans l'épithélium intestinal est inconnu jusqu'à ce jour, il sera primordial de déterminer la fonction de PLZF dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal colonique. Une

étudiante dans notre laboratoire s'intéresse à comprendre l'implication de PLZF dans le côlon par l'utilisation du modèle murin mutant en PLZF, soit le modèle luxoïde. À la lumière de ses résultats, il sera indispensable de croiser les souris déficientes pour la protéine CDP avec les souris luxoïdes afin de renforcer l'existence d'une interaction de CDP avec le gène PLZF.

Enfin, afin d'approfondir l'implication de la forme de CDP p110 dans les processus d'initiation de cancer colorectal, il sera essentiel de générer un modèle de souris transgéniques pouvant surexprimer spécifiquement cette isoforme dans l'épithélium colonique. Cette approche pourrait mesurer la relation cause à effet entre l'apparition de CDP p110 et l'initiation de la tumorigénèse épithéliale intestinale. Il sera également utile d'effectuer le croisement entre les souris APC/Min et les souris transgéniques pour la forme de CDP p110 afin de mesurer la possibilité d'accentuer la formation de polypes coloniques dans les souris résultantes et de déterminer un lien entre la voie du Wnt et l'expression de CDP p110 dans les pathologies intestinales.

## Remerciements

Cette section me permet de dire un merci chaleureux à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de maîtrise.

Mon directeur de recherche François Boudreau est la première personne que je tiens à remercier. Merci François pour tes nombreux « pep talk » qui m'ont souvent soulagée de mes inquiétudes parfois farfelues et sans raison! Merci pour nos discussions scientifiques, tes encouragements et tes conseils judicieux. Tu as grandement contribué à ma formation tant scientifique que personnelle. Garde ta bonne humeur et ta passion contagieuse pour la recherche. Encore MERCI!!! Mais attention, ce n'est pas fini, car heureusement pour toi, tu as la chance de m'endurer encore pour quelques années, le temps de faire mon doctorat!

Je veux également remercier mes collègues et amis de laboratoire; Christine, Geneviève D., Carine, Jean-Philippe, Mathieu, Geneviève B. et Sonia. Chacun de vous avez participé d'une façon bien différente à ma formation scientifique. Vous êtes une belle gang que je ne suis pas prête d'oublier! Je tiens à dire un merci particulier à ma stagiaire Karine Brochu-Gaudreau (automne 2005) qui a travaillé très fort sur le projet de l'interaction entre CDP et le gène PLZF et dont quelques résultats sont présentés dans ce mémoire. Un merci spécial à ma complice Christine avec qui j'ai partagé plusieurs discussions scientifiques et plusieurs potins, mais aussi beaucoup de partys!

Je remercie aussi tout le corps professoral, les étudiants et les secrétaires du département d'Anatomie et biologie cellulaire qui ont répondu à mes questions et qui ont, de ce fait, facilité mon travail durant ma maîtrise.

Je ne peux terminer ce mémoire sans dire merci à mes parents Pierre et Diane et à ma sœur Brigitte. Vous avez toujours été là pour m'écouter et pour m'encourager à aller toujours plus loin. Vous m'avez également enseigné à ne jamais abandonner et que nos efforts finissent toujours par être récompensés! Un merci particulier à ma mère à qui j'ai plusieurs fois cassé les oreilles avec CDP et PLZF!

Finalement, je remercie les Dr Claude Asselin et Simon Labbé qui ont accepté de réviser ce mémoire.



## Bibliographie

- Andres, V., Nadal-Ginard, B. et Mahdavi, V. (1992) Clox, a mammalian homeobox gene related to *Drosophila* cut, encodes DNA-binding regulatory proteins differentially expressed during development. *Development* **116**: 321-334.
- Arends, J. W. (2000) Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J. Pathol.* **190**: 412-416.
- Ball, H. J., Melnick, A., Shaknovich, R., Kohanski, R. A. et Licht, J. D. (1999) The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4106-4113.
- Barberis, A., Superti-Furga, G. et Busslinger, M. (1987) Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. *Cell* **50**: 347-359.
- Beaulieu, J. F. et Quaroni, A. (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* **280**: 599-608.
- Bjerknes, M. et Cheng, H. (1981) Methods for the isolation of intact epithelium from the mouse intestine. *Anat. Rec.* **199**: 565-574.
- Boudreau, F., Rings, E. H., Swain, G. P., Sinclair, A. M., Suh, E. R., Silberg, D. G., Scheuermann, R. H. et Traber, P. G. (2002) A novel colonic repressor element regulates intestinal gene expression by interacting with Cux/CDP. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5467-5478.
- Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. et Brattain, D. E. (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* **41**: 1751-1756.
- Buaas, F. W., Kirsh, A. L., Sharma, M., McLean, D. J., Morris, J. L., Griswold, M. D., de Rooij, D. G. et Braun, R. E. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* **36**: 647-652.
- Burkhardt, B. R., Yang, M. C., Robert, C. E., Greene, S. R., McFadden, K. K., Yang, J., Wu, J., Gao, Z. et Wolf, B. A. (2005) Tissue-specific and glucose-responsive expression of the pancreatic derived factor (PANDER) promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1730**: 215-225.
- Chen, Z., Brand, N. J., Chen, A., Chen, S. J., Tong, J. H., Wang, Z. Y., Waxman, S. et Zelent, A. (1993) Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* **12**: 1161-1167.
- Coqueret, O., Bérube, G. et Nepveu, A. (1998) The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *EMBO J.* **17**: 4680-4694.

- Coqueret, O., Bérube, G. et Nepveu, A. (1996) DNA binding by cut homeodomain proteins is down-modulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**: 24862-24868.
- Coqueret, O., Martin, N., Bérube, G., Rabbat, M., Litchfield, D. W. et Nepveu, A. (1998) DNA binding by cut homeodomain proteins is down-modulated by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **273**: 2561-2566.
- Cosma, M. P. (2002) Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol. Cell* **10**: 227-236.
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J. et Pandolfi, P. P. (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* **36**: 653-659.
- David, G., Alland, L., Hong, S. H., Wong, C. W., DePinho, R. A. et Dejean, A. (1998) Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* **16**: 2549-2556.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. et Hay, R. T. (2000) Regulation of transcription factors by protein degradation. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 1207-1219.
- Dexter, D. L., Sprenulli, E. N., Fligiel, Z., Barbosa, J. A., Vogel, R., VanVoorhees, A. et Calabresi, P. (1981) Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am. J. Med.* **71**: 949-956.
- Dharmasathaphorn, K., McRoberts, J. A., Mandel, K. G., Tisdale, L. D. et Masui, H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* **246**: 204-208.
- Dufort, D. et Nepveu, A. (1994) The human cut homeodomain protein represses transcription from the c-myc promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4251-4257.
- el-Hodiri, H. M. et Perry, M. (1995) Interaction of the CCAAT displacement protein with shared regulatory elements required for transcription of paired histone genes. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3587-3596.
- Ellis, T., Gambardella, L., Horcher, M., Tschanz, S., Capol, J., Bertram, P., Jochum, W., Barrandon, Y. et Busslinger, M. (2001) The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes Dev.* **15**: 2307-2319.
- Fawcett, D. W. (1965) SURFACE SPECIALIZATIONS OF ABSORBING CELLS. *J. Histochem. Cytochem.* **13**: 75-91.
- Gambus, G., de Bolos, C., Andreu, D., Franci, C., Egea, G. et Real, F. X. (1993) Detection of the MUC2 apomucin tandem repeat with a mouse monoclonal antibody. *Gastroenterology* **104**: 93-102.
- Glickman, M. H. et Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**: 373-428.

- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, M. et Nepveu, A. (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell* **14**: 207-219.
- Goulet, B., Watson, P., Poirier, M., Leduy, L., Bérube, G., Meterissian, S., Jolicoeur, P. et Nepveu, A. (2002) Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. *Cancer Res.* **62**: 6625-6633.
- Gregorieff, A. et Clevers, H. (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* **19**: 877-890.
- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M. A., Minucci, S. et Pelicci, P. G. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**: 815-818.
- Gupta, S., Luong, M. X., Bleuming, S. A., Miele, A., Luong, M., Young, D., Knudsen, E. S., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L. et Stein, G. S. (2003) Tumor suppressor pRB functions as a co-repressor of the CCAAT displacement protein (CDP/cut) to regulate cell cycle controlled histone H4 transcription. *J. Cell. Physiol.* **196**: 541-556.
- Harada, R., Dufort, D., Denis-Larose, C. et Nepveu, A. (1994) Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* **269**: 2062-2067.
- Harada, R., Bérube, G., Tamplin, O. J., Denis-Larose, C. et Nepveu, A. (1995) DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 129-140.
- Hardy, R. G., Meltzer, S. J. et Jankowski, J. A. (2000) ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* **321**: 886-889.
- Hoatlin, M. E., Zhi, Y., Ball, H., Silvey, K., Melnick, A., Stone, S., Arai, S., Hawe, N., Owen, G., Zelent, A. et Licht, J. D. (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* **94**: 3737-3747.
- Hocker, M. et Wiedenmann, B. (1998) Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **859**: 160-174.
- Hoffmann, I., Draetta, G. et Karsenti, E. (1994) Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* **13**: 4302-4310.
- Hong, S. H., David, G., Wong, C. W., Dejean, A. et Privalsky, M. L. (1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 9028-9033.

- Ibla, J. C., Khoury, J., Kong, T., Robinson, A. et Colgan, S. P. (2006) Transcriptional Repression of Na-K-2Cl<sup>-</sup> Co-transporter (NKCC1) by Hypoxia Inducible Factor-1. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*
- Ikeda, R., Yoshida, K., Tsukahara, S., Sakamoto, Y., Tanaka, H., Furukawa, K. et Inoue, I. (2005) The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBF $\beta$ 1. *J. Biol. Chem.* **280**: 8523-8530.
- Jones, P. A. et Baylin, S. B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 415-428.
- Kadonaga, J. T. (2004) Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* **116**: 247-257.
- Kim, K. M. et Shibata, D. (2002) Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* **21**: 5441-5449.
- Lee, Y. C., Higashi, Y., Luu, C., Shimizu, C. et Strott, C. A. (2005) Sp1 elements in SULT2B1b promoter and 5'-untranslated region of mRNA: Sp1/Sp2 induction and augmentation by histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett.* **579**: 3639-3645.
- Lemieux, N., Zhang, X. X., Dufort, D. et Nepveu, A. (1994) Assignment of the human homologue of the Drosophila Cut homeobox gene (CUTL1) to band 7q22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **24**: 191-193.
- Li, J. Y., English, M. A., Ball, H. J., Yeyati, P. L., Waxman, S. et Licht, J. D. (1997) Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 22447-22455.
- Li, S., Aufiero, B., Schiltz, R. L. et Walsh, M. J. (2000) Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor and CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 7166-7171.
- Li, S., Moy, L., Pittman, N., Shue, G., Aufiero, B., Neufeld, E. J., LeLeiko, N. S. et Walsh, M. J. (1999) Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 7803-7815.
- Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. et Xiong, Y. (1994) Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**: 2261-2268.
- Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr et Evans, R. M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**: 811-814.
- Lu, X. F., Jiang, X. G., Lu, Y. B., Bai, J. H. et Mao, Z. B. (2005) Characterization of a novel positive transcription regulatory element that differentially regulates the insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene in senescent cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 22606-22615.

- Luong, M. X., van der Meijden, C. M., Xing, D., Hesselton, R., Monuki, E. S., Jones, S. N., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., Neufeld, E. J. et van Wijnen, A. J. (2002) Genetic ablation of the CDP/Cux protein C terminus results in hair cycle defects and reduced male fertility. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1424-1437.
- Lusser, A. et Kadonaga, J. T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**: 1192-1200.
- Mailly, F., Bérube, G., Harada, R., Mao, P. L., Phillips, S. et Nepveu, A. (1996) The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5346-5357.
- Martin, P. J., Delmotte, M. H., Formstecher, P. et Lefebvre, P. (2003) PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nucl. Recept.* **1**: 6.
- McConnell, M. J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltane, J. M., Malani, R. B., Staudt, L. M. et Licht, J. D. (2003) Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 9375-9388.
- Melnick, A. et Licht, J. D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93**: 3167-3215.
- Melnick, A., Ahmad, K. F., Arai, S., Polinger, A., Ball, H., Borden, K. L., Carlile, G. W., Prive, G. G. et Licht, J. D. (2000) In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6550-6567.
- Ménard, D., Pothier, P. et Gallo-Payet, N. (1987) Epidermal growth factor receptors during postnatal development of the mouse colon. *Endocrinology* **121**: 1548-1554.
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E. et Givol, D. (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* **54**: 3391-3395.
- Michl, P. et Downward, J. (2006) CUTL1: a key mediator of TGFbeta-induced tumor invasion. *Cell. Cycle* **5**: 132-134.
- Michl, P., Knobel, B. et Downward, J. (2006) CUTL1 is phosphorylated by protein kinase A, modulating its effects on cell proliferation and motility. *J. Biol. Chem.*
- Michl, P., Ramjaun, A. R., Pardo, O. E., Warne, P. H., Wagner, M., Poulosom, R., D'Arrigo, C., Ryder, K., Menke, A., Gress, T. et Downward, J. (2005) CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer. Cell.* **7**: 521-532.
- Miller, D. et Crane, R. K. (1961) The digestive function of the epithelium of the small intestine. II. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **52**: 293-298.

- Moon, N. S., Bérube, G. et Nepveu, A. (2000) CCAAT displacement activity involves CUT repeats 1 and 2, not the CUT homeodomain. *J. Biol. Chem.* **275**: 31325-31334.
- Moon, N. S., Rong Zeng, W., Premdas, P., Santaguida, M., Bérube, G. et Nepveu, A. (2002) Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas. *Int. J. Cancer* **100**: 429-432.
- Moon, N. S., Premdas, P., Truscott, M., Leduy, L., Bérube, G. et Nepveu, A. (2001) S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6332-6345.
- Nepveu, A. (2001) Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* **270**: 1-15.
- Neufeld, E. J., Skalnik, D. G., Lievens, P. M. et Orkin, S. H. (1992) Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. *Nat. Genet.* **1**: 50-55.
- Nishio, H. et Walsh, M. J. (2004) CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 11257-11262.
- Orphanides, G. et Reinberg, D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C. et Taketo, M. (1995) Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 4482-4486.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. et Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**: 773-785.
- Passmore, L. A. et Barford, D. (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* **379**: 513-525.
- Pearson, B. E., Nasheuer, H. P. et Wang, T. S. (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2081-2095.
- Perreault, N. et Jean-Francois, B. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* **224**: 354-364.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D. et Ganz, T. (2002) The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 156-170.
- Quaggin, S. E., Heuvel, G. B., Golden, K., Bodmer, R. et Igarashi, P. (1996) Primary structure, neural-specific expression, and chromosomal localization of Cux-2, a second murine homeobox gene related to Drosophila cut. *J. Biol. Chem.* **271**: 22624-22634.

- Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R. et Zelent, A. (1995) Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* **86**: 4544-4552.
- Sancho, E., Batlle, E. et Clevers, H. (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 695-723.
- Sansregret, L., Goulet, B., Harada, R., Wilson, B., Leduy, L., Bertoglio, J. et Nepveu, A. (2006) The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 2441-2455.
- Santaguida, M. et Nepveu, A. (2005) Differential regulation of CDP/Cux p110 by cyclin A/Cdk2 and cyclin A/Cdk1. *J. Biol. Chem.* **280**: 32712-32721.
- Santaguida, M., Ding, Q., Bérube, G., Truscott, M., Whyte, P. et Nepveu, A. (2001) Phosphorylation of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor by cyclin A-Cdk1 modulates its DNA binding activity in G(2). *J. Biol. Chem.* **276**: 45780-45790.
- Scherer, S. W., Neufeld, E. J., Lievens, P. M., Orkin, S. H., Kim, J. et Tsui, L. C. (1993) Regional localization of the CCAAT displacement protein gene (CUTL1) to 7q22 by analysis of somatic cell hybrids. *Genomics* **15**: 695-696.
- Sekine, S., Shibata, T., Sakamoto, M. et Hirohashi, S. (2002) Target disruption of the mutant beta-catenin gene in colon cancer cell line HCT116: preservation of its malignant phenotype. *Oncogene* **21**: 5906-5911.
- Semple, T. U., Quinn, L. A., Woods, L. K. et Moore, G. E. (1978) Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.* **38**: 1345-1355.
- Sheikh, M. S., Li, X. S., Chen, J. C., Shao, Z. M., Ordonez, J. V. et Fontana, J. A. (1994) Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* **9**: 3407-3415.
- Sinclair, A. M., Lee, J. A., Goldstein, A., Xing, D., Liu, S., Ju, R., Tucker, P. W., Neufeld, E. J. et Scheuermann, R. H. (2001) Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice. *Blood* **98**: 3658-3667.
- Sitterlin, D., Tiollais, P. et Transy, C. (1997) The RAR alpha-PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain. *Oncogene* **14**: 1067-1074.
- Tavares, A. T., Tsukui, T. et Izpisua Belmonte, J. C. (2000) Evidence that members of the Cut/Cux/CDP family may be involved in AER positioning and polarizing activity during chick limb development. *Development* **127**: 5133-5144.
- Truscott, M., Raynal, L., Wang, Y., Bérube, G., Leduy, L. et Nepveu, A. (2004) The N-terminal region of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor

functions as an autoinhibitory domain that modulates DNA binding. *J. Biol. Chem.* **279**: 49787-49794.

Truscott, M., Raynal, L., Premdas, P., Goulet, B., Leduy, L., Bérube, G. et Nepveu, A. (2003) CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 3013-3028.

Tufarelli, C., Fujiwara, Y., Zappulla, D. C. et Neufeld, E. J. (1998) Hair defects and pup loss in mice with targeted deletion of the first cut repeat domain of the Cux/CDP homeoprotein gene. *Dev. Biol.* **200**: 69-81.

Valarche, I., Tissier-Seta, J. P., Hirsch, M. R., Martinez, S., Goridis, C. et Brunet, J. F. (1993) The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* **119**: 881-896.

van Gurp, M. F., Pratap, J., Luong, M., Javed, A., Hoffmann, H., Giordano, A., Stein, J. L., Neufeld, E. J., Lian, J. B., Stein, G. S. et van Wijnen, A. J. (1999) The CCAAT displacement protein/cut homeodomain protein represses osteocalcin gene transcription and forms complexes with the retinoblastoma protein-related protein p107 and cyclin A. *Cancer Res.* **59**: 5980-5988.

van Wijnen, A. J., Aziz, F., Grana, X., De Luca, A., Desai, R. K., Jaarsveld, K., Last, T. J., Soprano, K., Giordano, A. et Lian, J. B. (1994) Transcription of histone H4, H3, and H1 cell cycle genes: promoter factor HiNF-D contains CDC2, cyclin A, and an RB-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 12882-12886.

van Wijnen, A. J., van Gurp, M. F., de Ridder, M. C., Tufarelli, C., Last, T. J., Birnbaum, M., Vaughan, P. S., Giordano, A., Krek, W., Neufeld, E. J., Stein, J. L. et Stein, G. S. (1996) CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 11516-11521.

Wolf, D. H. et Hilt, W. (2004) The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**: 19-31.

Yeyati, P. L., Shaknovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H. J., Waxman, S., Nason-Burchenal, K., Dmitrovsky, E., Zelent, A. et Licht, J. D. (1999) Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18**: 925-934.

Yoon, S. O. et Chikaraishi, D. M. (1994) Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *J. Biol. Chem.* **269**: 18453-18462.

Zeng, W. R., Scherer, S. W., Koutsilieris, M., Huizenga, J. J., Filteau, F., Tsui, L. C. et Nepveu, A. (1997) Loss of heterozygosity and reduced expression of the CUTL1 gene in uterine leiomyomas. *Oncogene* **14**: 2355-2365.



Zhang, T., Xiong, H., Kan, L.-X., Zhang, C.-K., Jiao, X.-F., Fu, G., Zhang, Q.-H., Lu, L., Tong, J.-H., Gu, B.-W., Yu, M., Liu, J.-X., Licht, J., Waxman, S., Zelent, A., Chen, E. et Chen, S.-J. (1999) Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 11422-11427.